



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΕΣΤΗΣ Κ. ΜΑΥΡΙΔΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ
ΘΑΛΑΣΣΙΝΑ ΤΡΟΦΙΜΑ**

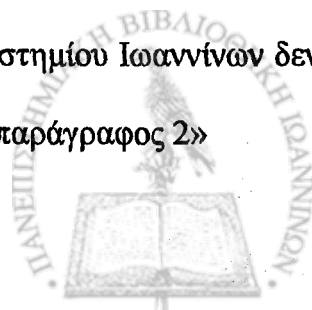
**ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ Κ. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 2020, παράγραφος 2»



ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΕΩΣ: 23/11/1999

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΣΥΝΕΔΡΙΑΣΗ ΑΡΙΘΜ.: 395α/21/12/1999

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

1. ΧΡΥΣΑΝΘΗ Β. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ, Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

ΜΕΛΗ:

2. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΕΦΕΡΙΑΔΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας
3. ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ ΛΕΒΕΙΔΙΩΤΟΥ – ΣΤΕΦΑΝΟΥ, Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 12/2/2000

ΟΝΟΜΑΤΑ ΜΕΛΩΝ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

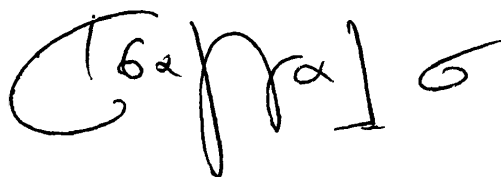
1. ΑΓΓΕΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ, Καθηγητής Φυσιολογίας
2. ΑΝΕΣΤΗΣ Κ. ΜΑΥΡΙΔΗΣ, Καθηγητής Μικροβιολογίας
3. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΕΦΕΡΙΑΔΗΣ, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας
4. ΜΙΧΑΛΗΣ ΜΑΛΑΜΑΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας
5. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΠΟΥΛΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας
6. ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ ΛΕΒΕΙΔΙΩΤΟΥ – ΣΤΕΦΑΝΟΥ, Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
7. ΧΡΥΣΑΝΘΗ Β. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ, Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 27/2/2006

ΒΑΘΜΟΣ ΜΕ ΤΟΝ ΟΠΟΙΟ ΕΓΙΝΕ ΑΠΟΔΕΚΤΗ Η ΔΙΑΤΡΙΒΗ: «ΑΡΙΣΤΑ»

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ: Καθηγητής ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ ΤΣΙΑΝΟΣ

Η ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ



ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



*Στους γονείς μου,
Κώστα και Αμαλία*



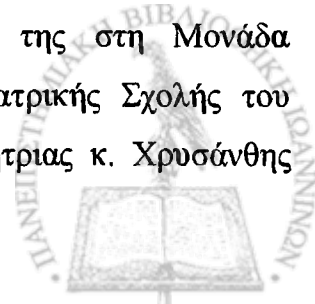
ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η κατανάλωση θαλασσινών τροφίμων αυξάνεται διεθνώς εξαιτίας της αλλαγής των διαιτητικών συνηθειών και συγκεκριμένα της τάσης αποφυγής τροφίμων ζωικής προέλευσης για λόγους υγείας και μακροζωίας. Αυτή η αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες έχει οδηγήσει σε αύξηση των κρουσμάτων και των εξάρσεων τροφιμογενών επιδημιών, που σχετίζονται με την κατανάλωση αλιευμάτων, και ιδιαίτερα των τοξικών οι οποίες οφείλονται σε κατανάλωση ψαριών και οστρακοειδών μολυσμένων από βιοτοξίνες.

Οι βιοτοξίνες, που μολύνουν τα θαλασσινά τρόφιμα, κατατάσσονται, ανάλογα με την προέλευσή τους, σε τρεις κατηγορίες: α) Σε τοξίνες που παράγονται κατά τη βακτηριακή αποδόμηση (σήψη) των ψαριών. Σε αυτές ανήκει η ισταμίνη η οποία σχετίζεται με τη δηλητηρίαση από σκομβροειδείς ιχθείς. β) Σε τοξίνες που παράγονται από διάφορα είδη δινομαστιγιωτών (τοξικές άλγες), τα οποία περιοδικά πολλαπλασιάζονται υπερβολικά στις θάλασσες εξαιτίας διαφόρων περιβαλλοντικών μεταβολών (αλλαγή θερμοκρασίας, αλατότητας, φωτός και θρεπτικών ουσιών) και σχετίζονται με τα τοξικά σύνδρομα της κατανάλωσης οστρακοειδών (Διαρροϊκή δηλητηρίαση, Παραλυτική δηλητηρίαση, Αμνησιακή δηλητηρίαση και Νευροτοξική δηλητηρίαση). γ) Σε τοξίνες που παράγονται από βακτήρια. Σε αυτές ανήκουν οι τετροδοτοξίνες που σχετίζονται με τη δηλητηρίαση από κατανάλωση ψαριών.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της παραγωγής ορισμένων βιοτοξινών σε θαλασσινά τρόφιμα. Συγκεκριμένα μελετήθηκε: α) Η παραγωγή ισταμίνης σε δείγματα τόννου, υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασιακής (κακο-) μεταχείρισης. β) Η ικανότητα παραγωγής ισταμίνης από τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν στα παραπάνω δείγματα τόννου. γ) Η συμβολή του κάθε βακτηριακού στελέχους στη συγκέντρωση ισταμίνης στον μυϊκό ιστό του ψαριού. δ) Η ικανότητα ανίχνευσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων έξι διαφορετικών εκλεκτικών υποστρωμάτων. Παράλληλα έγινε προσπάθεια δημιουργίας νέων εκλεκτικών υποστρωμάτων τροποποιώντας τη σύνθεση των υπάρχοντων υποστρωμάτων. ε) Τέλος διερευνήθηκε εργαστηριακά το αίτιο της επιδημικής έξαρσης τροφιμογενούς δηλητηρίασης εξαιτίας κατανάλωσης τοξικών μυδιών, η οποία εκδηλώθηκε στην περιοχή της Θεσσαλονίκης κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Η διατριβή πραγματοποιήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος της στη Μονάδα Μικροβιολογίας Τροφίμων του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη της Επικούρου Καθηγήτριας κ. Χρυσάνθης



Παπαδοπούλου. Ένα μέρος της πραγματοποιήθηκε στην Μονάδα Θαλάσσιων Βιοτοξινών (Marine Biotoxins Unit) του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων (Food Hygiene Laboratory, FHL) του Κεντρικού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας της Βρετανίας στο Colindale του Λονδίνου (Central Public Health Laboratory Service, CPHLS, UK) υπό την επίβλεψη της Dr. Moira Brett.

Επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες αλλά και την ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσα Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Χρυσάνθη Παπαδοπούλου τόσο για την ανάθεση της συγκεκριμένης πειραματικής μελέτης και τις σημαντικές υποδείξεις της, την πολύτιμη καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθειά της σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας, όσο και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ επί 6μηνο στο FHL του CPHLS της Βρετανίας στο πλαίσιο της διατριβής μου.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τη Διευθύντρια του Marine Biotoxins Unit του FHL, CPHLS, Dr. Moira Brett για την καθοδήγηση, την εκμάθηση τεχνικών και τη βοήθεια που μου προσέφερε στη διάρκεια των πειραματισμών οι οποίοι πραγματοποιήθηκαν κατά την παραμονή μου στη Μονάδα Θαλάσσιων Βιοτοξινών του PHLS. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω το Διευθυντή του FHL Καθηγητή κ. Eric Bolton για τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την παραμονή μου στο εργαστήριό του.

Επιθυμώ επίσης να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Στον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας κ. Κωνσταντίνο Σεφεριάδη για την εξαιρετικά πολύτιμη συμβολή και βοήθειά του στην πραγματοποίηση των μετρήσεων της ισταμίνης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης καθώς και για τη διάθεση του Συστήματος HPLC με το οποίο πραγματοποίησα ορισμένους πειραματισμούς.

Στην Επίκουρο Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Σταματίνα Λεβειδιώτου-Στεφάνου για το ενδιαφέρον που επέδειξε και την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Επίσης, εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ανέστη Μαυρίδη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, για τις χρήσιμες συζητήσεις που είχαμε σχετικά με την παρούσα διατριβή, τον Καθηγητή κ. Άγγελο Ευαγγέλου, Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, για την ενθάρρυνση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Μιχαήλ Μάλαμα και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Κωνσταντίνο Χαραλαμπίοπουλο για τις πολύτιμες υποδείξεις τους.



Θέλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή του Φυσικού Τμήματος της Σχολής Θετικών Επιστημών κ. Κωνσταντίνο Ιωαννίδη για τη συμβολή του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας κ. Βίκυ Καλφακάκου για το συνεχές ενδιαφέρον της.

Ευχαριστίες επίσης εκφράζω στον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας Κ. Ευστάθιο Φριλίγγο για τη βοήθεια που μου προσέφερε στην εκμάθηση και λειτουργία της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στη Λέκτορα κ. Γεωργία Βρυώνη της οποίας οι συμβουλές σε θέματα Μικροβιολογίας και μεθοδολογίας ήταν πολύτιμες.

Ακόμη θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον τ. Διευθυντή του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου Ειδικών Παθήσεων Θεσσαλονίκης Δρ. Βασίλειο Δανηλίδη και στη Διευθύντρια του ίδιου εργαστηρίου Δρ. Αθηνά Κανσουζίδου για την αποστολή των δειγμάτων μυδιών κατά τη διάρκεια εκδήλωσης της επιδημίας από κατανάλωση μυδιών στη Θεσσαλονίκη το 2000 και την παροχή όλων των σχετικών πληροφοριών.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω το στρατιωτικό κτηνίατρο Δρ. Γιώργο Φιλιούση για την συλλογή δειγμάτων μυδιών από την Χαλάστρα Θεσσαλονίκης.

Στη σύζυγό μου κ. Παναγιώτα Γούσια εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες για τη βοήθειά της στην εκτέλεση των χειρισμών σε πειραματόζωα καθώς και για τη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Στη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και στο Βρετανικό Συμβούλιο εκφράζω τις ευχαριστίες μου για την από κοινού χρηματοδότηση μέρους της παρούσας διατριβής και την κάλυψη των εξόδων μετακίνησης και διαμονής μου στη Βρετανία στο πλαίσιο κοινού διμερούς προγράμματος Ελληνο-Βρετανικής Συνεργασίας (Bilateral Joint Research Programmes, 1999).

Ευχαριστώ επίσης όλο το επιστημονικό και τεχνικό προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής, τις κ.κ. Όλγα Σάρρα, Ελευθερία Τσάντα, Βασιλική Οικονόμου, καθώς και τους συναδέλφους μου Δρ. Α. Ντόντορου, Δρ. Ι. Αποστόλου, Α. Σαλαμούρα, Γ. Ζάκα και Δ. Μπασέα για την καλή συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου.

Η εργασία μου δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση της οικογένειάς μου στην οποία οφείλω ευγνωμοσύνη.

Τέλος, ευχαριστώ όλους που με οποιοδήποτε τρόπο με βοήθησαν κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής.



Περιεχόμενα

A. Γενικό μέρος	1
Εισαγωγή	3
A.1 Δηλητηρίαση από σκομβροειδείς ιχθείς (Δηλητηρίαση από ισταμίνη)	9
A.1.1. Ιστορική ανασκόπηση	9
A.1.2. Επιδημιολογία	10
A.1.2.1. Ευρώπη	10
A.1.2.2. Αμερική	12
A.1.2.3. Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία	14
A.1.2.4. Ασία	15
A.1.2.5. Αφρική	16
A.1.3. Αιτιοπαθογένεια της δηλητηρίασης από ισταμίνη	16
A.1.3.1. Ισταμίνη (χημεία – παραγωγή στα τρόφιμα)	17
A.1.3.2. Δράσεις της ενδογενούς ισταμίνης	24
A.1.3.3. Δράσεις της εξωγενούς (τροφιμογενούς) ισταμίνης	25
A.1.3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση των συμπτωμάτων της δηλητηρίασης από ισταμίνη	27
A.1.4. Τρόφιμα που ευθύνονται για δηλητηρίαση από ισταμίνη	30
A.1.4.1. Ψάρια	30
A.1.4.1.1. Παραγωγή ισταμίνης στα ψάρια	34
A.1.4.1.2. Ισταμινοπαραγωγά βακτήρια στα ψάρια	38
A.1.4.2. Τυριά	42
A.1.4.3. Οινοπνευματώδη ποτά	43
A.1.4.4. Άλλα τρόφιμα	43
A.1.5. Κλινική εικόνα	44
A.1.6. Διάγνωση	45
A.1.7. Θεραπεία	46
A.1.8. Μέθοδοι ανίχνευσης ισταμίνης	46
A.1.8.1. Ημιποσοτικές μέθοδοι	47
A.1.8.1.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)	47
A.1.8.1.2. Ενζυμικές μέθοδοι	49
A.1.8.2. Ποσοτικές μέθοδοι	50
A.1.8.2.1. Φθορισμομετρική μέθοδος	50



A.1.8.2.2. <i>Ανοσοενζυμικές μέθοδοι</i>	50
A.1.8.2.3. <i>Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης</i>	53
A.1.8.3. <i>Καλλιεργητικές μέθοδοι ανίχνευσης ισταμινopαραγωγών βακτηρίων</i>	54
A.2. Διαρροϊκή δηλητηρίαση από κατανάλωση δίθυρων	59
A.2.1. <i>Αιτιοπαθογένεια</i>	59
A.2.1.1. <i>Βιολογικές δράσεις οκαδαϊκού οξέος και δινοφυσιτοξινών στα θηλαστικά</i>	64
A.2.2. <i>Επιδημιολογία</i>	65
A.2.2.1. <i>Ιστορική ανασκόπηση</i>	65
A.2.2.2. <i>Ευρώπη</i>	66
A.2.2.3. <i>Ασία</i>	67
A.2.2.4. <i>Αμερική</i>	68
A.2.3. <i>Κλινική εικόνα – Θεραπεία</i>	68
A.2.4. <i>Πρόληψη – μέτρα προφύλαξης</i>	69
A.2.5. <i>Ανίχνευση DSP τοξινών</i>	69
A.2.5.1. <i>Βιολογικές μέθοδοι</i>	69
A.2.5.2. <i>Ανοσοενζυμικές μέθοδοι</i>	71
A.2.5.3. <i>Μέθοδοι κυτταροτοξικότητας</i>	72
A.2.5.4. <i>Χημικές μέθοδοι</i>	73
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	75
B.1. Σκοπός	77
B.2. Υλικά και Μέθοδοι	79
B.2.1. <i>Μελέτη παραγωγής ισταμίνης σε δείγματα τόννου υπό διάφορες συνθήκες θερμικής μεταχείρισης</i>	79
B.2.1.1. <i>Δείγματα</i>	79
B.2.1.2. <i>Δειγματοληψία</i>	79
B.2.1.3. <i>Πείραμα θερμικής κακομεταχείρισης</i>	79
B.2.1.4. <i>Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ισταμίνης στα δείγματα τόννου</i>	82
B.2.1.5. <i>Στατιστική ανάλυση</i>	83
B.2.1.6. <i>Μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων τόννου</i>	83



B.2.2.	Μελέτη ικανότητας παραγωγής ισταμίνης, πουτρεσκίνης και καδαβερίνης από βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από δείγματα τόννου	87
B.2.3.	Μελέτη της συμβολής των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από τους τόννους που υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στη συγκέντρωση της ισταμίνης	88
B.2.3.1.	Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA	88
B.2.3.2.	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	89
B.2.4.	Συγκριτική μελέτη της ικανότητας απομόνωσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων διαφόρων εκλεκτικών υποστρωμάτων	90
B.2.4.1.	Μελέτη των υπαρχόντων στερεών και υγρών υποστρωμάτων	91
B.2.4.2.	Μελέτη νέων υποστρωμάτων που αναπτύξαμε τροποποιώντας τη σύνθεση υπαρχόντων υποστρωμάτων για την απομόνωση ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων	93
B.2.5.	Εργαστηριακή διερεύνηση του αιτίου της επιδημικής έξαρσης διαρροϊκής δηλητηρίασης εξαιτίας της κατανάλωσης μυδιών στη Θεσσαλονίκη	95
B.2.5.1.	Ιστορικό	95
B.2.5.2.	Ανίχνευση διαρροϊκών τοξινών σε δίθυρα	97
B.2.4.2.1.	Δείγματα	97
B.2.4.2.2.	Εκχόλιση των τοξινών	97
B.2.4.2.3.	Βιολογική μέθοδος με χρήση ποντικιών	98
B.3.	Αποτελέσματα	99
B.3.1.	Μελέτη παραγωγής ισταμίνης σε δείγματα τόννου υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασιακής μεταχείρισης	99
B.3.1.1.	Πείραμα θερμικής κακομεταχείρισης	99
B.3.1.2.	Μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων τόννου	101
B.3.1.3.	Είδη απομονωθέντων βακτηρίων από θερμικά κακομεταχειρισμένο τόννο	110
B.3.1.4.	Σύγκριση φθορισμομετρικής μεθόδου με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης στα δείγματα τόννου	112



B.3.1.5. Δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης ιστιδίνης, ορνιθίνης και λυσίνης των στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματα τόννου	113
B.3.1.6. Μετρήσεις ισταμίνης από τις καλλιέργειες των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα δείγματα τόννου	115
B.3.1.7. Μελέτη της ικανότητας απομόνωσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων σε εκλεκτικά υποστρώματα	120
B.3.1.8. Μελέτη της ικανότητας ανίχνευσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων σε υπόστρωμα πτωχό σε θρεπτικές ουσίες	125
B.3.2. Αποτελέσματα εργαστηριακής διερεύνησης του αιτίου της επιδημίας διαρροϊκής δηλητηρίασης εξαιτίας κατανάλωσης μυδιών στη Θεσσαλονίκη	128
B.4. Συζήτηση	131
B.5. Συμπεράσματα	149
Περίληψη	151
Summary	153
Βιβλιογραφία	155
Υπόμνημα	170



A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τροφιμογενή νοσήματα μεταδίδονται με παθογόνους μικροοργανισμούς ή με τις τοξίνες μικροοργανισμών και αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα Δημόσιας Υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο. Σχετικά πρόσφατα (1997), ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) όρισε ως τροφιμογενή νοσήματα «τα νοσήματα λοιμώδους ή τοξικής φύσης, τα οποία προκαλούνται ή θεωρείται ότι προκαλούνται από κατανάλωση τροφίμων ή νερού» (WHO, 1997). Σύμφωνα με τον WHO υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο συμβαίνουν 1,5 δισεκατομμύριο διαρροϊκά περιστατικά και ότι περισσότεροι από 3 εκατομμύρια θάνατοι παιδιών ηλικίας κάτω των 5 ετών οφείλονται σε κατανάλωση τροφίμων, που περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς ή τοξίνες μικροοργανισμών (WHO, 1997). Μάλιστα, εκτιμάται ότι για διάφορους λόγους (αδυναμία καταγραφής, μη δήλωση περιστατικών, απουσία διάγνωσης, μη επίσκεψη στο γιατρό κ.τ.λ) οι υπολογισμοί αυτοί πιθανόν είναι κατά 100 έως 300 φορές μικρότεροι από τα πραγματικά συμβάντα (Lund και συν., 2000).

Τα τροφιμογενή νοσήματα ταξινομούνται κυρίως σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις λοιμώξεις του γαστρεντερικού σωλήνα και τις δηλητηριάσεις από κατανάλωση τοξινών. Η πρώτη κατηγορία οφείλεται στην κατανάλωση τροφίμων, που περιέχουν κάποιον παθογόνο μικροοργανισμό (τροφιμογενείς λοιμώξεις). Η δεύτερη κατηγορία οφείλεται στην κατανάλωση τροφίμων, τα οποία περιέχουν κάποιο μικροοργανισμό, που παράγει τοξίνη όταν βρεθεί μέσα στο ανθρώπινο σώμα (τοξικές τροφολοιμώξεις), ή στην κατανάλωση κάποιας επικίνδυνης τοξίνης που έχει προσχηματιστεί μέσα στο τρόφιμο (τροφοτοξινώσεις) και η οποία προκαλεί τα συμπτώματα της νόσου μετά την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου (Παπαδοπούλου, 2001· D' Mello 2003).

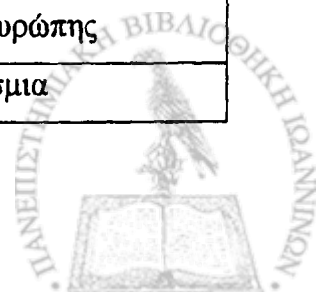
Όμως, στις δύο παραπάνω κατηγορίες τροφιμογενών νοσημάτων έχει προστεθεί και μια τρίτη, εξίσου σημαντική κατηγορία, η οποία άρχισε να απασχολεί την επιστημονική κοινότητα ήδη από την δεκαετία του '60. Πρόκειται για νοσήματα τα οφείλονται σε κατανάλωση τοξικών ουσιών (τροφοτοξικώσεις ή τροφικές δηλητηριάσεις), όπως τα βαρέα μέταλλα, οι πολυχλωριωμένοι υδρογονάνθρακες (PCBs), οι διοξίνες, διάφορες χημικές και φαρμακευτικές ουσίες (λιπάσματα, εντομοκτόνα, παρασιτοκτόνα, ορμόνες κ.τ.λ.), ραδιενεργά κατάλοιπα και άλλες ουσίες, οι οποίες τα τελευταία χρόνια προσελκύουν όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των ερευνητών, των αρμόδιων υγειονομικών αρχών (EFSA, FDA, WHO), των καταναλωτών και των μέσων μαζικής επικοινωνίας.



Στον Πίνακα 1 αναφέρονται συνοπτικά οι κύριοι επιμολυντές των τροφίμων ζωικής προέλευσης, με βάση τα πρόσφατα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας (Food Safety Information Bulletin 1999, Food Standards Agency, 2000a-b, Food Standards Agency 2001, a-h, Food Standards Agency, 2002, D'Mello, 2003).

Πίνακας 1. Οι κυριότεροι επιμολυντές των τροφίμων ζωικής προέλευσης

Είδος τροφίμου	Επιμολυντής	Σημερινή κατάσταση Γεωγραφική εξάπλωση
Πρόβειο / Βοδινό κρέας	<i>E. coli</i>	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
	BSE / scrapie prion	Σε ύφεση/ Παγκόσμια
	Φαρμακευτικά κατάλοιπα εξαιτίας κτηνιατρικών πράξεων	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
	Διοξίνες (εξαιτίας ατυχημάτων)	Σε εξέλιξη/ Σε ορισμένες χώρες (Βέλγιο/Σκανδιναβικές)
Πρόβειο κρέας	Ραδιενεργά κατάλοιπα εξαιτίας ατυχημάτων	Σε εξέλιξη/ Σε ορισμένες χώρες (Κεντρική & Β. Ευρώπη).
Χοιρινό κρέας	Σαλμονέλα (<i>Salmonella spp.</i>)	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
	Οχρατοξίνη Α	Σε εξέλιξη/ Σε ορισμένες χώρες
	Ηπατίτιδα Ε	Σε εξέλιξη/ Σε χώρες Ε.Ε.
Κρέας Πουλερικών	Σαλμονέλα (<i>Salmonella spp.</i>)	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
	Καμπυλοβακτηρίδιο	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
	Λιστέρια	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
Αυγά	Σαλμονέλα (<i>Salmonella spp.</i>)	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
Γάλα	Λιστέρια (<i>L. Monocytogenes</i>)	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
	Μυκοβακτηρίδιο (<i>M. paratuberculosis</i>)	Σε εξέλιξη/ Σε χώρες της Ευρώπης
	Διοξίνες	Σε εξέλιξη/ Σε ορισμένες Ευρωπαϊκές χώρες
	Αφλατοξίνες	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
	Ραδιενεργά κατάλοιπα	Σε εξέλιξη/ Σε ορισμένες χώρες Κεντρικής και Β. Ευρώπης
Τυριά	Λιστέρια (<i>L. Monocytogenes</i>)	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια



Πίνακας 1. (συνέχεια)

Είδος τροφίμου	Επιμολυντής	Σημερινή κατάσταση Γεωγραφική εξάπλωση
Ψάρια	Υδράργυρος	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
	Αρσενικό	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
	Πολυχλωριωμένα (PCBs)	διφαινόλια Σε εξέλιξη/ Σε ορισμένες χώρες/ σε σολωμό ιχθυοκαλλιέργειας
	Διοξίνες	Σε εξέλιξη/ Σε ορισμένες χώρες σε σολωμό ιχθυοκαλλιέργειας
	Δονάκιο (<i>V. parahaemolyticus</i>)	Σε εξέλιξη/ Σε θερμές χώρες (N. & Κεντρική Αμερική, N. Ασία)
	Ισταμίνη	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
Οστρακοειδή	Τοξίνες του διαρροϊκού συνδρόμου (DSP) από τοξικές άλγες	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
	Ηπατίτιδα Α	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια
	E. coli	Σε εξέλιξη/ Παγκόσμια

Τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης ευθύνονται για το 18-20% των επιδημικών εξάρσεων τροφιμογενούς προέλευσης. Από αυτά, τα θαλασσινά από μόνα τους ευθύνονται για το 10,5% των επιδημικών εξάρσεων και για το 3,6% των μεμονωμένων περιστατικών, γεγονός που δείχνει ότι τα θαλασσινά τρόφιμα αποτελούν ένα από τα συχνότερα αίτια τροφιμογενών νόσων. Επιπλέον τα θαλασσινά τρόφιμα είναι ξενιστές των περισσότερων από τα γνωστά παθογόνα (κυρίως βακτήρια και ιούς) του ανθρώπου [Πίνακας 2] (Huss, 1995· Huss, 1997· Tucker, 1997).

Παρόλο που στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις, το αίτιο της νόσου παραμένει αταυτοποίητο, εντούτοις σύμφωνα με τα υπάρχοντα επιδημιολογικά δεδομένα, η πλειονότητα (80%) των περιστατικών που αποδίδονται σε κατανάλωση ψαριών οφείλονται σε βιοτοξίνες και κυρίως σε ισταμίνη, ενώ τα περιστατικά από κατανάλωση οστρακοειδών συνήθως οφείλονται σε μικροοργανισμούς (Huss, 1997· Tucker, 1997· Lehane και Olley, 1999· Lehane και Olley, 2000).



Πίνακας 2. Τροφιμογενείς επιδημίες και περιστατικά εξαιτίας κατανάλωσης θαλασσινών τροφίμων σε σχέση με το σύνολο των τροφίμων ζωικής προέλευσης (Tucker, 1997)

Κατηγορία Τροφίμων	Επιδημίες / επιδημικές εξάρσεις	Μεμονωμένα περιστατικά
Κόκκινα κρέατα (Βοδινό, Χοιρινό)	298 (5,6%) *	11.517 (6,9%) *
Πουλερικά (Κοτόπουλα, Γαλοπούλες)	164 (1,3%)	10.563 (6,3%)
Θαλασσινά (Ψάρια, Οστρακοειδή)	558 (10,5%)	5.980 (3,6%)
Όλα τα τρόφιμα (ζωικής & φυτικής προέλευσης)	5.317	166.579

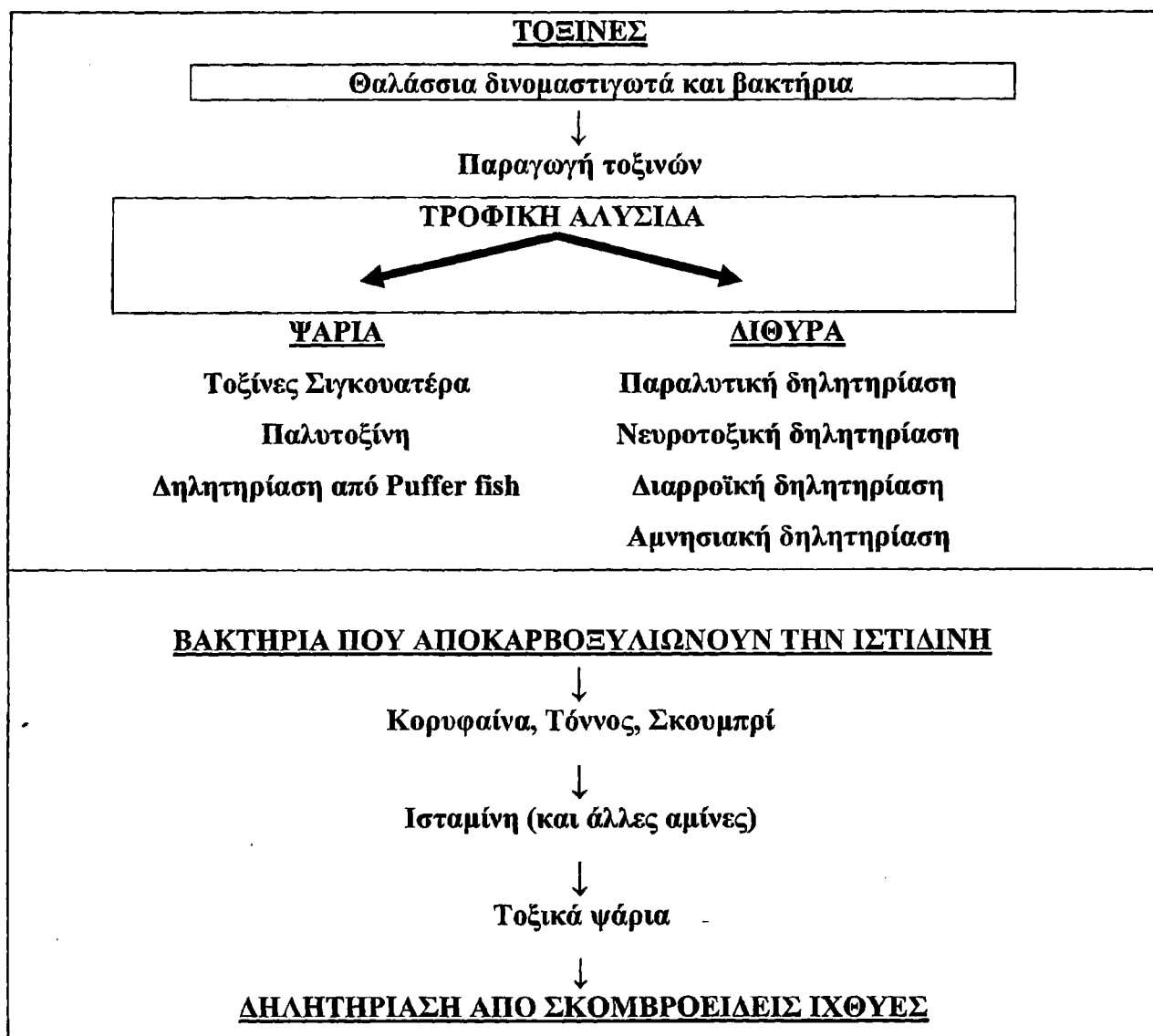
* Ποσοστό επί του συνόλου των τροφιμογενών επιδημικών εξάρσεων

Οι τοξίνες που ανιχνεύονται στα θαλασσινά τρόφιμα είναι εξαιρετικά ισχυρές τοξίνες, οι οποίες δεν καταστρέφονται κατά την θέρμανση ή οποιαδήποτε άλλη επεξεργασία των θαλασσινών (κάπνιση, αλάτιση, κονσερβοποίηση, συντήρηση σε όξος, επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας κ.τ.λ.). Οι τοξίνες αυτές, γνωστές ως βιοτοξίνες (marine toxins ή marine biotoxins) προέρχονται κυρίως από βακτήρια που παράγουν ισταμίνη (ισταμινοπαραγωγά βακτήρια) και από το φυτοπλαγκτόν (τοξικές άλγες) [Σχήμα 1].

Οι δηλητηριάσεις από κατανάλωση τοξικών θαλασσινών τροφίμων είναι αποτέλεσμα της κατανάλωσης ιστών (σάρκα ψαριών, σάρκα οστρακοειδών) που περιέχουν τοξίνη. Σύμφωνα με τα δεδομένα του Center for Disease Control (CDC), το 28% των επιδημιών και το 13% των μεμονωμένων περιστατικών δηλητηριάσεων από τοξικά θαλασσινά οφείλεται σε σκομβροτοξίνη – ουσιαστικά ισταμίνη – (Scombroid fish poisoning). Επίσης, σύμφωνα με την ίδια πηγή, από τις τροφιμογενείς επιδημίες που αποδίδονται σε κατανάλωση θαλασσινών το μεγαλύτερο ποσοστό (32%) οφείλεται σε τοξίνες της ομάδας Ciguatera και το μικρότερο ποσοστό (2,5%) οφείλεται σε τοξίνες του παραλυτικού συνδρόμου εξ οστρακοειδών (Paralytic Shellfish Poisoning, PSP) [Πίνακας 3]. Είναι λοιπόν φανερό ότι η δηλητηρίαση από ισταμίνη αποτελεί ένα από τα συχνότερα και σημαντικότερα αίτια τροφικής δηλητηρίασης από ψάρια.



Σχήμα 1. Προέλευση των αιτιών των τροφιμογενών νόσων, που οφείλονται σε θαλασσινά τρόφιμα (Πηγή: Tucker, 1997)



Πίνακας 3. Αίτια δηλητηριάσεων από τοξικά θαλασσινά τρόφιμα (Πηγή: Tucker, 1997).

Τοξίνη	Αριθμός Επιδημιών	Αριθμός μεμονωμένων περιστατικών
Τοξίνη της ομάδας Ciguatera	179 (32%) *	791 (13%) **
Σκομβροτοξίνη (ισταμίνη)	157 (28%)	757 (13%)
Τοξίνη PSP	13 (2,5%)	137 (2%)
Όλες οι τοξίνες	349 (62,5%)	1685 (28%)

* Ποσοστό επί του συνόλου των επιδημιών δηλητηριάσεων από κατανάλωση θαλασσινών

** Ποσοστό επί του συνόλου των μεμονωμένων περιστατικών δηλητηριάσεων από κατανάλωση θαλασσινών



Σύμφωνα με τις σύγχρονες τάσεις της ιατρικής και διαιτολογίας, τα θαλασσινά τρόφιμα και ιδιαίτερα τα ψάρια, αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα της υγιεινής διατροφής, γιατί προσφέρουν υψηλής βιολογικής αξίας πρωτεΐνες, ευεργετικά n-3 λιπαρά οξέα και ιχθυοστοιχεία και λίγες θερμίδες. Όμως δεν πρέπει να παραβλέπονται και ορισμένα αρνητικά χαρακτηριστικά των θαλασσινών τροφίμων, τα οποία μπορεί να έχουν συνέπειες στη Δημόσια Υγεία: είναι ιδιαίτερα ευπαθή και αλλοιώνονται πολύ γρήγορα, επηρεάζονται άμεσα από την μόλυνση του περιβάλλοντος, συσχετίζονται με αλλεργίες και με τροφιμογενείς νόσους. Οι τελευταίες είναι κυρίως συνέπεια της ρύπανσης του υδάτινου περιβάλλοντος με παθογόνους μικροοργανισμούς, τοξίνες και τοξικά απόβλητα.

Η μόλυνση των θαλασσών αποτελεί μέγιστο περιβαλλοντικό πρόβλημα με άμεσες συνέπειες στην υγιεινή και την ασφάλεια των θαλασσινών τροφίμων. Παρά το γεγονός ότι πέρασαν περισσότερα από 40 χρόνια από τότε που καταγράφηκαν στην Ιαπωνία τα πρώτα περιστατικά της νόσου Minamata (δηλητηρίαση από υδράργυρο), το πρόβλημα αντί να περιοριστεί, αντίθετα σήμερα έχει εξαπλωθεί σε μεγαλύτερη γεωγραφική έκταση και απειλεί την υγεία των καταναλωτών σε παγκόσμια κλίμακα πλέον [Πίνακας 1]. Τα ραδιενεργά κατάλοιπα, που ανιχνεύονταν πριν μερικές δεκαετίες μόνον σε ψάρια που αλιεύονταν σε περιοχές πυρηνικών δοκιμών, τώρα ανιχνεύονται και σε άλλες περιοχές με πλέον πρόσφατα περιστατικά την ανίχνευση τριτίου σε ψάρια και οστρακοειδή των ακτών του Κάρντιφ στην Βρετανία (Food Standards Agency, 2001g).

Μεγάλη ανησυχία επίσης υπάρχει για την αύξηση των μικροβιακών αιτιών μόλυνσης των θαλασσινών. Η μόλυνση των οστρακοειδών με ιό Ηπατίτιδας Α, αποτελεί ένα σημαντικό κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών σε Ευρώπη, ΗΠΑ και Κίνα. Ήδη στις ΗΠΑ και την Βρετανία τα παράκτια ύδατα κατηγοριοποιούνται σε «εγκεκριμένα», «κατάλληλα υπό όρους», «περιορισμένης χρήσης» και «ακατάλληλα» για την εξαίεση οστρακοειδών, ανάλογα με τον βαθμό μόλυνσης τους με βάση την συγκέντρωση της *Escherichia coli* (Food Standards Agency, 2001f). Το φαινόμενο της κόκκινης παλίρροιας εξαιτίας της υπέρμετρης συγκέντρωσης τοξικών αλγών, παλαιότερα εντοπιζόνταν σε τροπικές χώρες, αλλά την τελευταία δεκαετία εμφανίζεται και σε εύκρατες και ψυχρές χώρες και σήμερα απειλεί τις οστρακοκαλλιέργειες όλων των χωρών της Ε.Ε., μεσογειακών – περιλαμβανομένης της Ελλάδας – και χωρών της Βαλτικής θάλασσας.

Στα επόμενα κεφάλαια γίνεται ανασκόπηση των υπαρχόντων βιβλιογραφικών δεδομένων για τις δύο συνηθέστερες δηλητηριάσεις από κατανάλωση θαλασσινών, τη Δηλητηρίαση από σκομβροειδείς ιχθύες και τη Διαρροϊκή δηλητηρίαση από τοξικά δίθυρα, οι οποίες σχετίζονται με το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής.



A.1 Δηλητηρίαση από σκομβροειδείς ιχθύες (Δηλητηρίαση από ισταμίνη)

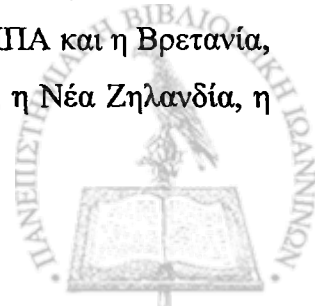
A.1.1. Ιστορική ανασκόπηση

Η δηλητηρίαση από σκομβροειδείς ιχθύες είναι γνωστή και ως δηλητηρίαση από σκομβροτοξίνη ή σκομβροτοξική δηλητηρίαση ή δηλητηρίαση από ισταμίνη (Scrombrotoxic Poisoning, Scombroid Fish Poisoning, Histamine Fish Poisoning). Οφείλεται σε κατανάλωση ψαριών της οικογένειας των σκομβροειδών (Scombridae και Scomberesocidae), τα οποία περιέχουν ασυνήθιστα υψηλές συγκεντρώσεις ισταμίνης. Η συγκέντρωση της ισταμίνης στον μυϊκό ιστό των ψαριών οφείλεται σε αλλοίωση τους εξαιτίας της ανάπτυξης ορισμένων ειδών βακτηρίων, τα οποία έχουν την ικανότητα να αποκαρβοξυλιώνουν την ιστιδίνη των μυών σε ισταμίνη.

Η πρώτη αναφορά δηλητηρίασης από κατανάλωση σκομβροειδών ιχθύων έγινε από τον Henderson το 1828 (Henderson, 1830). Έκτοτε και μέχρι το πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα μόνον λίγες αναφορές σε σποραδικά περιστατικά υπάρχουν. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στο ότι η δηλητηρίαση από ισταμίνη ήταν μη αναγνωρίσιμη και ως εκ τούτου υποεκτιμώμενη νόσος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η αναφορά του Κποκ (1888), που αποδίδει το θάνατο του βασιλιά Ερρίκου του 1^{ου} της Αγγλίας στην κατανάλωση μεγάλης ποσότητας σκουμπριού (*Scomber scombrus*). Επίσης ο Halstead αναφέρει ότι οι υγειονομικές αρχές της Κούβας είχαν θέσει απαγόρευση κατανάλωσης του ψαριού *Scomberomus regalis* από τον Ιούλιο του 1914 (Halstead, 1967).

Οι πρώτοι επιστήμονες, που αναγνώρισαν τη δηλητηρίαση από ισταμίνη ως σοβαρή αιτία τροφιμογενούς νόσου από κατανάλωση ψαριών ήταν οι Ιάπωνες, οι οποίοι στις αρχές της δεκαετίας του 1950 (1951-1954) κατέγραψαν 14 μαζικά περιστατικά δηλητηρίασης από κατανάλωση σκομβροειδών ψαριών, που αφορούσαν 1215 άτομα (Kawabata και συν., 1956). Μάλιστα το πρώτο περιστατικό αφορούσε 700 άτομα και μέχρι σήμερα παραμένει η μεγαλύτερη καταγεγραμμένη επιδημική έξαρση δηλητηρίασης από ισταμίνη.

Στις υπόλοιπες χώρες η δηλητηρίαση από ισταμίνη άρχισε να αναγνωρίζεται πολύ αργότερα, τη δεκαετία του 1970. Από το 1970 μέχρι σήμερα οι χώρες με τις περισσότερες αναφορές περιστατικών δηλητηρίασης από ισταμίνη είναι η Ιαπωνία, οι ΗΠΑ και η Βρετανία, ενώ λιγότερα περιστατικά έχουν αναφερθεί από χώρες όπως ο Καναδάς, η Νέα Ζηλανδία, η



Γαλλία, η Γερμανία, η Νορβηγία, η Σουηδία, η Τσεχία, η Σλοβακία, η Ολλανδία, η Αυστραλία, η Σρι Λάνκα, η Ινδονησία, η Νότια Αφρική και η Αίγυπτος.

A.1.2. Επιδημιολογία

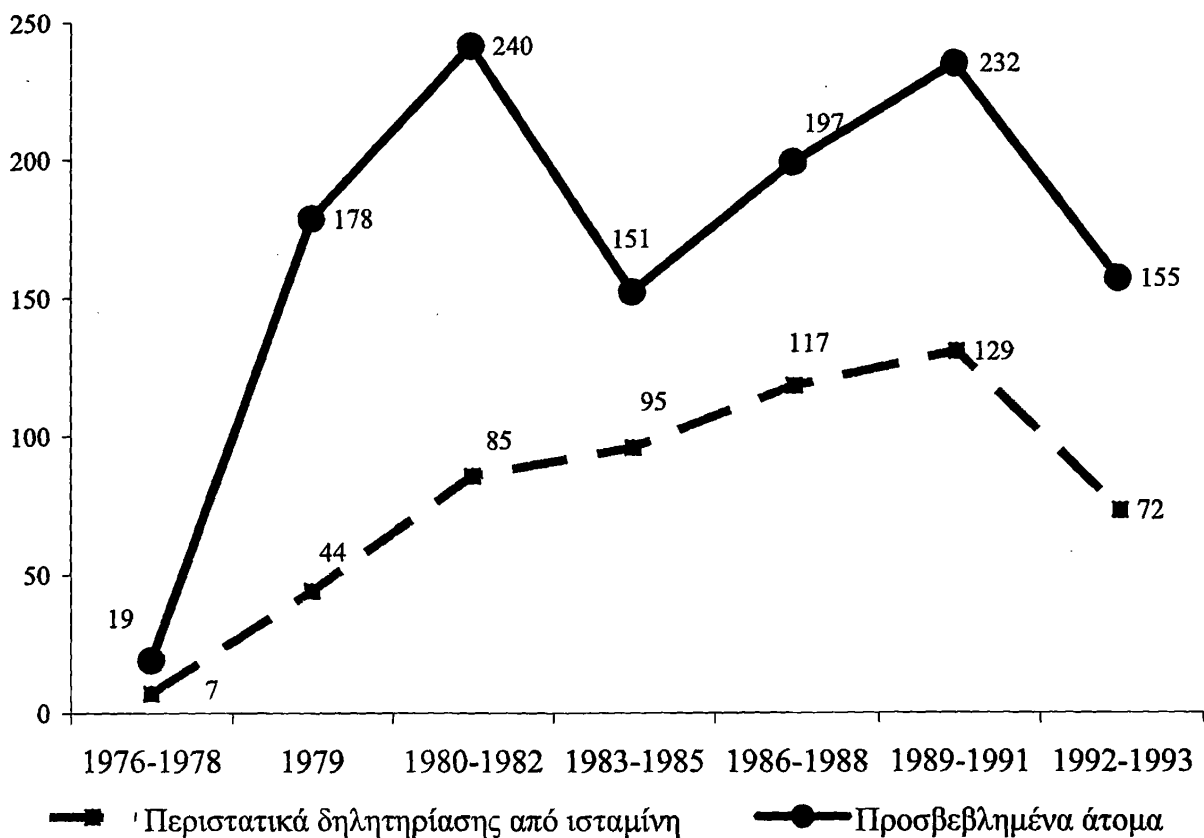
A.1.2.1. Ευρώπη

Στη γηραιά ήπειρο περιστατικά τοξίκωσης από ισταμίνη αναφέρονται κυρίως στη Βρετανία, Γαλλία και Ιταλία. Από τις υπόλοιπες χώρες υπάρχουν σποραδικές μόνο αναφορές μεμονωμένων περιστατικών.

Στη Βρετανία το πρώτο περιστατικό δηλητηρίασης από ισταμίνη αφορά πέντε ναύτες του πλοίου Triton of Leigh (Henderson, 1830) οι οποίοι νόσησαν μετά από κατανάλωση παλαμίδας. Οι μεταγενέστερες αναφορές στη συγκεκριμένη χώρα είναι σποραδικές. Μετά το 1976 έχουν αναφερθεί αρκετές επιδημικές εξάρσεις στην Αγγλία, Σκωτία και Ουαλία, λόγω της όλο και λεπτομερέστερης καταγραφής περιστατικών στην περιοχή. Οι επιδημικές εξάρσεις στην Αγγλία μεταξύ 1976 και 1990 αναγράφονται στο Γράφημα 1.

Οι Gilbert και συν. (1980) αναφέρουν 50 περιπτώσεις τοξίκωσης από ισταμίνη και την προσβολή 196 ατόμων μεταξύ 1976 και 1978. Τα εμπλεκόμενα τρόφιμα ήταν κυρίως καπνιστά ή κονσερβοποιημένα τρόφιμα (καπνιστή παλαμίδα, παπαλίνα και σαρδέλες). Οι Bartholomew και συν. (1987) αναφέρουν 258 περιπτώσεις τοξίκωσης από ισταμίνη. Σε αυτές τις περιπτώσεις προσβλήθηκαν 638 άτομα στη δεκαετία από το 1976 έως το 1986. Μετά το 1986, η Scoging (Scoging, 1998) αναφέρει 405 περιστατικά τοξίκωσης από ισταμίνη, εκ των οποίων το 60% αποτελούσε μεμονωμένες περιπτώσεις, το 26% γενικευμένες επιδημικές εξάρσεις και το 14% οικογενείς περιπτώσεις. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα υπεύθυνα τρόφιμα ήταν νωπός, κατεψυγμένος ή κονσερβοποιημένος τόννος, καθώς και σκουμπρί. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τα 405 περιστατικά, μόνο στα 148 το υπεύθυνο τρόφιμο είχε αυξημένες συγκεντρώσεις ισταμίνης. Από τα υπόλοιπα 257 περιστατικά, στα 101 τα συμπτώματα ήταν τυπικά της δηλητηρίασης από ισταμίνη, χωρίς όμως να ανιχνευθεί τοξική συγκέντρωση στα τρόφιμα, ενώ στα 156 τα συμπτώματα δεν ήταν τυπικά του συνδρόμου.





Γράφημα 1. Επιδημικές εξάρσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη στην Αγγλία μεταξύ 1976 και 1990 (Πηγή: Scoging, 1991)

Στη Γαλλία η πρώτη καταγεγραμμένη επιδημική έξαρση σημειώθηκε στο Παρίσι τον Αύγουστο του 1941 και αφορούσε 29 άτομα που έφαγαν νωπό τόννο ο οποίος μεταφέρθηκε με κοινό φορτηγό μέχρι τον τόπο κατανάλωσης (Billon, 1978). Μια δεύτερη επιδημική έξαρση εκδηλώθηκε τον Ιούλιο του 1955 και αφορούσε 500 άτομα που κατανάλωσαν νωπό τόννο (Billon, 1978). Ο ίδιος συγγραφέας αναφέρει 10 ακόμα επιδημικές εξάρσεις που σημειώθηκαν μεταξύ 1976 και 1977 και οφείλονταν στην κατανάλωση νωπού τόννου. Οι επιδημικές εξάρσεις που έλαβαν χώρα στην περιοχή της Γαλλίας οφείλονταν κατά κύριο λόγο στην κατανάλωση νωπού τόννου. Εκτός αυτών έχουν αναφερθεί δύο επιδημικές εξάρσεις που αφορούσαν η μία 23 ναυτικούς στο λιμάνι της Βρέστης (Boutin και συν., 1997) και η δεύτερη 20 κρούσματα μεταξύ 86 ναυτών πολεμικού πλοίου του Γαλλικού Ναυτικού στο Νότιο Ατλαντικό (Boutin και συν., 1998).

Στην Ιταλία η τοξίκωση από ισταμίνη έχει επισημανθεί από τις αρχές του προηγούμενου αιώνα (Baccelli και Durante, 1910). Συγκεκριμένα επισημάνθηκαν περιστατικά τοξίκωσης από κατανάλωση τόννου σε διάφορες περιοχές της Ιταλίας. Οι Allica

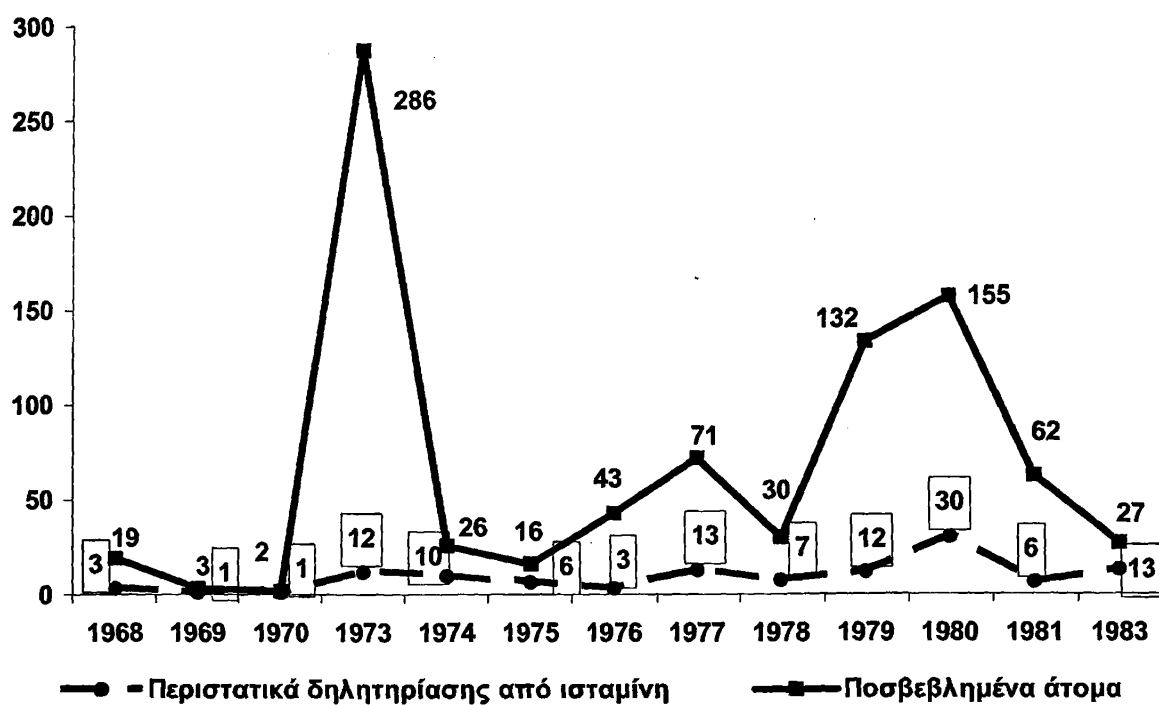
και συν. (1986) αναφέρουν την προσβολή 110 ατόμων από το 1970 έως το 1979. Το συχνότερα εμπλεκόμενο τρόφιμο ήταν ο νωπός τόννος. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα περισσότερα περιστατικά εκδηλώνονταν τον Ιούνιο κάθε έτους. Επίσης, στο Παλέρμο το 1979 εμφανίστηκε επιδημική έξαρση τοξίκωσης από ισταμίνη που προσέβαλε 250 άτομα (Lehane και Olley, 2000).

Όσον αφορά την Ελλάδα δεν υπάρχουν αναφορές στην ελληνική ή διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με περιστατικά σκομβροτοξικής δηλητηρίασης. Παρόλα ταύτα οι Τσιγούρη και συν. (1990) αναφέρουν ότι μετά από εξέταση 42 δειγμάτων αλίπαστων σαρδέλων, ανιχνεύτηκαν τοξικές συγκεντρώσεις ισταμίνης (έως και 1512 ppm) σε 4 από αυτά (9,5%).

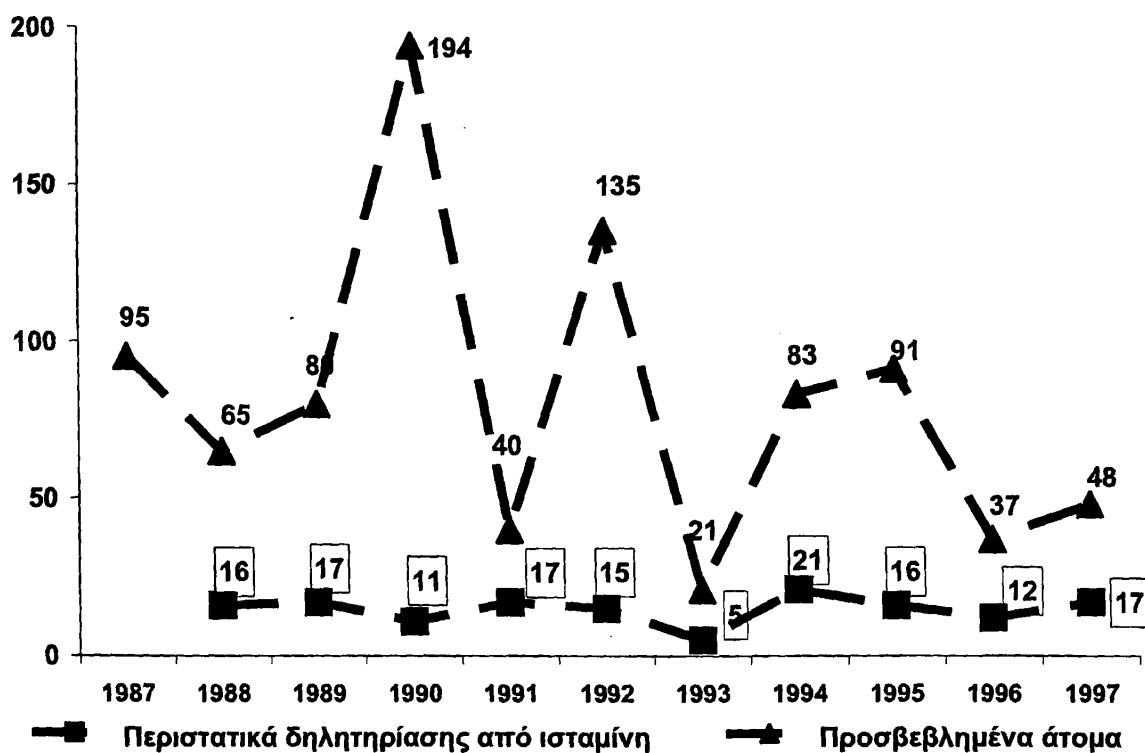
A.1.2.2. Αμερική

Στις Ηνωμένες Πολιτείες η καταγραφή των περιστατικών τοξίκωσης από ισταμίνη δεν είναι πλήρης, λόγω της προτεινόμενης, αλλά προαιρετικής αναφοράς των περιστατικών. Οι αρμόδιες αρχές προτείνουν την αναφορά του νοσήματος χωρίς να το κατατάσσουν στα νοσήματα υποχρεωτικής δήλωσης (Lehane και Olley, 2000). Το 1980 η δηλητηρίαση από σκομβροειδείς ιχθύες αποτελούσε τη δεύτερη συχνότερη τοξίκωση από κατανάλωση αλιευμάτων μετά τη δηλητηρίαση από σιγκουατέρα (Sours και Smith, 1980). Οι Lipp και Rose (1997) αναφέρουν ότι στο διάστημα μεταξύ 1983 και 1992, η συχνότερη δηλητηρίαση από αλιεύματα ήταν η δηλητηρίαση από ισταμίνη, με το 57% των τροφοδηλητηριάσεων να οφείλονται σε αυτή. Σε αντίθεση με την Ιαπωνία, στις Ηνωμένες Πολιτείες οι επιδημικές εξάρσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη αφορούσαν μικρό αριθμό ατόμων, συνήθως μικρότερο των πέντε (Lehane και Olley, 2000). Οι επιδημικές εξάρσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη στις ΗΠΑ μεταξύ 1968 – 1983 και 1986 – 1997 αναγράφονται στα Γραφήματα 2 και 3.





Γράφημα 2. Επιδημικές εξάρσεις στις Η.Π.Α. μεταξύ 1968 και 1983 (Πηγή: Taylor, 1985' Bean και συν., 1990)



Γράφημα 3. Επιδημικές εξάρσεις στις Η.Π.Α. μεταξύ 1987 και 1997 (Πηγή: Bean και συν., 1990' CDC, 1990' CDC, 2000)

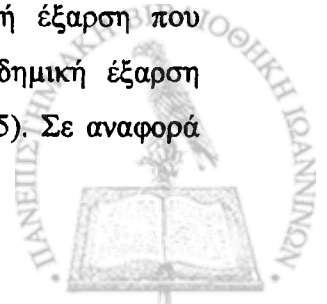


Στον Καναδά το πρώτο επιβεβαιωμένο περιστατικό τοξίκωσης από ισταμίνη καταγράφηκε το 1975, παρότι δεν αποκλείονται και προηγούμενα περιστατικά. Στις δεκαετίες του 70 και 80 το συχνότερα εμπλεκόμενο τρόφιμο σε τοξικώσεις από ισταμίνη ήταν ο κονσερβοποιημένος τόννος. Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει σε περιστατικό τοξίκωσης από ισταμίνη, γυναίκας που βρισκόταν υπό φαρμακευτική αγωγή, τον Οκτώβριο του 1980. Η ασθενής εμφάνισε συμπτώματα μετά από κατανάλωση καπνιστού σκουμπριού με μεγάλη, αλλά μη τοξική συγκέντρωση ισταμίνης (Todd και συν., 1981). Μεταξύ 1990 και 1995 τα συχνότερα εμπλεκόμενα ψάρια ήταν ο νωπός τόννος, το mahi – mahi και το σπαθόψαρο (Lehane και Olley 2000). Οι τρεις μεγαλύτερες επιδημικές εξάρσεις προκλήθηκαν από κατανάλωση καπνιστού σκουμπριού (Οκτώβριος 1987 με 14 περιστατικά), νωπού σπαθόψαρου (Ιούλιος 1991 με 12 περιστατικά) (Todd και συν., 1992) και νωπού τόννου (Αύγουστος 1994 με 12 περιστατικά). Τα περισσότερα περιστατικά προκλήθηκαν από εισαγόμενα ψάρια.

A.1.2.3. Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία

Στην περιοχή της Αυστραλίας έχουν αναφερθεί σποραδικά περιστατικά τοξίκωσης λόγω κατανάλωσης γοφαριού (Taylor, 1985), αυστραλιανού σολομού (Smart, 1992) και τόννου άγνωστης προέλευσης (Brown, 1993). Γενικά στην Αυστραλία η τοξίκωση από ισταμίνη είναι σχετικά σπάνια (Ashbolt και συν., 2002). Τα είδη ψαριών που συνήθως ενοχοποιούνται για την πρόκλησή της είναι το ψάρι escolar (*Lepidocybium flavobrunneum*) και το λαδόψαρο. Το 2001 καταγράφηκε από τους Yohannes και συν. (2002) περιστατικό τοξίκωσης από ισταμίνη 20 ατόμων που κατανάλωσαν ψάρι escolar. Περιστατικό τοξίκωσης από ισταμίνη συνέβη επίσης σε ξενοδοχείο μετά από κατανάλωση γεύματος butterflyfish κατά το οποίο νόσησαν 59 άτομα το 2003 (Ashbolt και συν., 2004). Εκτός αυτών ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει περιστατικό τοξίκωσης από ισταμίνη σε 9 άτομα λόγω της κατανάλωσης γεύματος ψαριού με κάρι σε καντίνα (Leask και συν., 2004).

Στην περιοχή της Νέας Ζηλανδίας το κυριότερο αίτιο πρόκλησης δηλητηρίασης από σκομβροειδείς ιχθύες είναι η κατανάλωση καπνιστού kawahai (*Arripis trutta*) (Bremer και συν., 2003). Μεταξύ 1973 και 1975 αναφέρθηκαν περιστατικά δηλητηρίασης από ισταμίνη λόγω κατανάλωσης κονσερβοποιημένου σκουμπριού, καπνιστού kahawai και κοκκαλιού. Εκτός αυτών οι αρχές της Νέας Ζηλανδίας διερεύνησαν την επιδημική έξαρση που εκδηλώθηκε στα νησιά του Σολομώντος το 1974. Η συγκεκριμένη επιδημική έξαρση προκλήθηκε από την κατανάλωση κονσερβοποιημένου τόννου (Taylor, 1985). Σε αναφορά



του Mitchell (1993) προς το Υπουργείο Υγείας της Νέας Ζηλανδίας αναφέρονται 19 επιδημικές εξάρσεις τοξίκωσης από ισταμίνη μεταξύ του Μαρτίου 1990 και του Ιουνίου 1993 που σημειώθηκαν στη Νέα Ζηλανδία. Οι επιδημικές εξάρσεις προκλήθηκαν κυρίως από την κατανάλωση καπνιστών ψαριών, όπως kawahai, σκουμπρί, σπαθόψαρο και λούτσος. Εκτός αυτών ο Mitchell ανέφερε και επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με τις συγκεντρώσεις ισταμίνης σε ψάρια που διατέθηκαν στην αγορά, συμπεραίνοντας ότι, λόγω του αυξημένου αριθμού δειγμάτων που υπερέβησαν την καθιερωμένη από την κρατική νομοθεσία συγκέντρωση ισταμίνης, οι επιδημιολογικοί έλεγχοι των ψαριών έπρεπε να ενταθούν. Μεταξύ 2001 και 2002 τρεις επιδημικές εξάρσεις τοξίκωσης από ισταμίνη επιβεβαιώθηκαν με σημαντικότερη αυτή του Δεκεμβρίου του 2002. Σε αυτή νόσησαν τουλάχιστον 20 άτομα από την κατανάλωση καπνιστού mahi-mahi.

A.1.2.4. Ασία

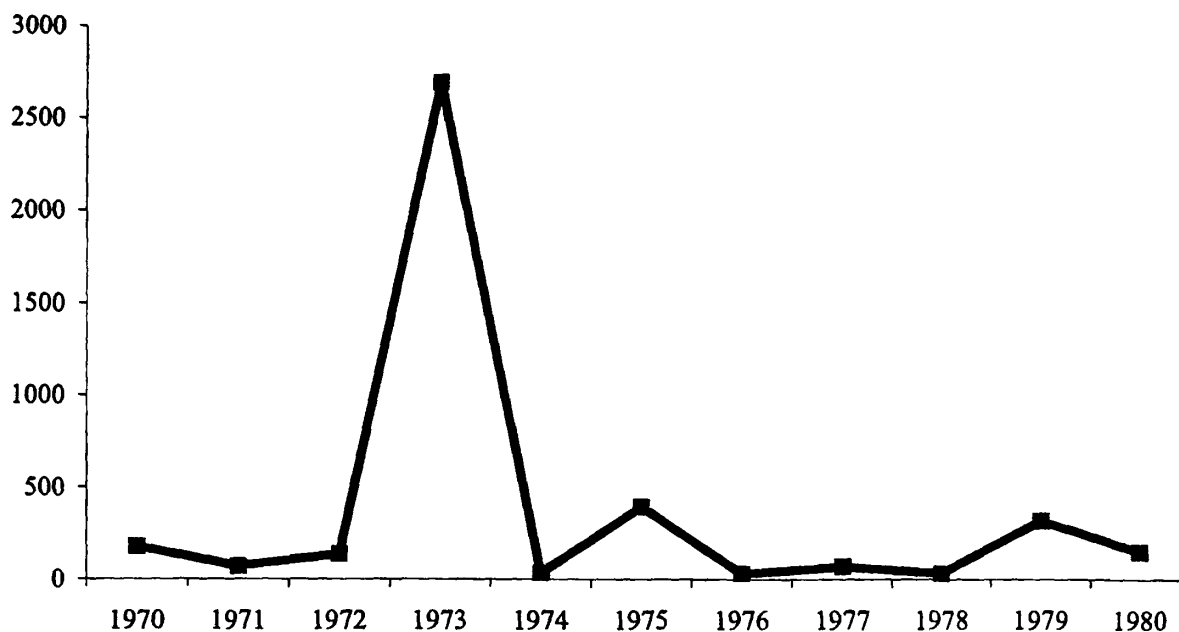
Κατά πάσα πιθανότητα η εμφάνιση του συνδρόμου στην περιοχή της Ασίας είναι αρκετά συχνή. Ο Mitchell (1993) αναφέρει ότι βρέθηκαν αυξημένες τιμές ισταμίνης σε αλιεύματα, που πωλούνταν σε ιχθυοπωλεία ασιατικών χωρών. Η παρατήρηση αυτή είναι δυνατόν να αιτιολογηθεί από την κατανάλωση ψαριών συντηρημένων με αλάτιση ή κάπνιση σε αυτές τις ασιατικές χώρες.

Ιδιαίτερα στην Ιαπωνία, η δηλητηρίαση από ισταμίνη έχει αναγνωριστεί ως σοβαρό αίτιο τροφικών δηλητηριάσεων.

Το Υπουργείο Υγείας και Ευζωίας της Ιαπωνίας αναφέρει 42 επιδημικές εξάρσεις που αφορούσαν 4122 περιστατικά δηλητηρίασης από ισταμίνη στη δεκαετία 1970 – 1980. Σε αυτές της επιδημικές εξάρσεις περιλαμβάνεται και η επιδημική έξαρση του 1973, στην οποία νόσησαν 2656 άτομα μετά από κατανάλωση αποξηραμένου ιαπωνικού σαφριδίου (*Trachurus japonicus*). Οι επιδημικές εξάρσεις στην Ιαπωνία μεταξύ 1970 και 1980 αναφέρονται συγκεντρωτικά στο Γράφημα 4.

Το αξιοπερίεργο των επιδημικών εξάρσεων στην Ιαπωνία είναι ότι αφορούσαν κατά κύριο λόγο επεξεργασμένα ψάρια και όχι νωπά, παρότι οι διατροφικές συνήθειες των Ιαπώνων περιλαμβάνουν την κατά κόρον κατανάλωση ωμού ψαριού υπό μορφή γευμάτων sushi (Lehane και Olley, 2000).





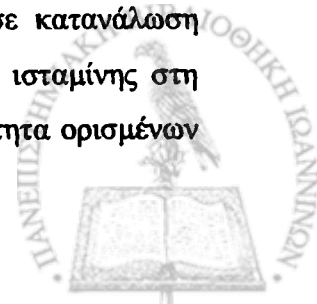
Γράφημα 4. Επιδημικές εξάρσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη στην Ιαπωνία μεταξύ 1970 και 1980 (Πηγή: Taylor, 1985)

A.1.2.5. Αφρική

Στην Αφρική δεν έχουν καταγραφεί κρούσματα δηλητηρίασης από ισταμίνη. Οι Ababouch και Afilal (1986) και οι Ababouch και συν. (1986) εξέτασαν δείγματα από τα ιχθυοπωλεία του Μαρόκου και ανέφεραν την ύπαρξη δυνητικά τοξικών συγκεντρώσεων ισταμίνης στα προς πώληση ψάρια. Το 1986 οι πωλήσεις μαροκινών κονσερβοποιημένων αλιευμάτων μειώνονταν διαρκώς λόγω των παραπόνων για την κακή ποιότητά τους και την ενοχοποίησή τους για την πρόκληση πολλών περιστατικών δηλητηρίασης από ισταμίνη (Lehane και Olley, 2000). Από τότε στο Μαρόκο εφαρμόζεται υποχρεωτικά ανάλυση επικινδυνότητας στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (Hazard Analysis at Critical Control Points, HACCP) στις ιχθυοκαλλιέργειες (Ababouch, 1997), σε μια προσπάθεια βελτίωσης της ποιότητας των εμπορευόμενων ψαριών.

A.1.3. Αιτιοπαθογένεια της δηλητηρίασης από ισταμίνη

Η δηλητηρίαση από ισταμίνη είναι γνωστό σήμερα ότι οφείλεται σε κατανάλωση τροφίμων και κυρίως ψαριών, τα οποία περιέχουν αυξημένη συγκέντρωση ισταμίνης στη σάρκα τους (Lehane και Olley, 2000). Ο πρώτος που διαπίστωσε την τοξικότητα ορισμένων



ψαριών ήταν ο Marcacci (1891). Χορηγώντας αίμα σκομβροειδών ψαριών ενδοπεριτοναϊκά ή ενδοφλέβια σε σκυλιά, παρατήρησε ότι εμφανιζόταν σπασμοί και παράλυση. Λίγο αργότερα ο Kossel (1896) και ο Thompson (1900) απέδωσαν το σύνδρομο σε τοξίνη την οποία και ονόμασαν πρωταμίνη. Ο Markoff (1939) συνοψίζοντας τη μέχρι τότε βιβλιογραφία, έδωσε το όνομα πελομετοξίνη (pelometoxin) στην υπεύθυνη τοξίνη.

Οι Suzuki και συν. (1912) ήταν οι πρώτοι ερευνητές, που ανίχνευσαν ισταμίνη σε εκχυλίσματα σάρκας τόννου. Αρκετά αργότερα ο Igarashi (1939) ανίχνευσε μεγάλες συγκεντρώσεις ισταμίνης στη σάρκα του ιαπωνικού σαφριδιού (*Scomber japonicus*), τις οποίες απέδωσε σε αυτολυτικές διεργασίες.

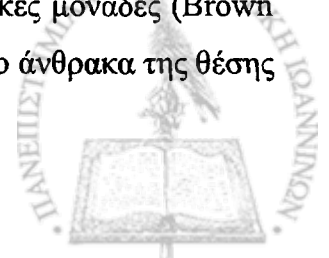
Ο Markov (1943) απέδωσε την παραγωγή τοξίνης σε βακτηριακές ζυμώσεις, στις οποίες μη τοξικές ουσίες που ανευρίσκονται στη σάρκα των ψαριών μετατρέπονται σε τοξικές ενώσεις. Τα κλινικά συμπτώματα της νόσου έκαναν την επιστημονική κοινότητα να υποπτευθεί τη συμμετοχή της ισταμίνης στην πρόκλησή της. Αυτός όμως που απέδωσε την πρόκληση της συγκεκριμένης δηλητηρίασης στην ισταμίνη ήταν ο Legroux (1946), ο οποίος μάλιστα πρότεινε τη χορήγηση αντισταμινικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της συγκεκριμένης δηλητηρίασης. Την άποψη του Legroux συμμερίστηκαν και οι Van Veen και Latuasan το 1950 (Halstead, 1967), ο Geiger (1955) και ο Pergola (1956).

Αρκετοί όμως ερευνητές, όπως οι Feldberg και Schiff (1930), ο Aiiiso (1954), ο Dack (1956) και ο Kawabata (1962), επισήμαναν ότι η *per os* ή εντερική χορήγηση μεγάλων συγκεντρώσεων ισταμίνης στον άνθρωπο δεν είναι απαραίτητα τοξική, πιθανώς λόγω της αδρανοποίησής της στο γαστρεντερικό σωλήνα. Στη συνέχεια αυτών ο Guggenheim (1951) απέδειξε την ικανότητα των βακτηρίων να παράγουν ισταμίνη από ιστιδίνη. Οι Kawabata και συν. (1955) πρότειναν την ύπαρξη και άλλων τοξινών που είναι πιο τοξικές ή δρουν συνεργικά με την ισταμίνη, δίνοντας σε αυτές τη γενική ονομασία σαυρίνη.

Πρέπει να τονιστεί ότι οι διάφοροι ερευνητές παρατήρησαν εξαρχής ότι τα ψάρια που ενοχοποιούνταν για την πρόκληση τοξίκωσης από ισταμίνη, δεν είχαν συντηρηθεί ή ψυχθεί υπό κατάλληλες συνθήκες (Halstead, 1967).

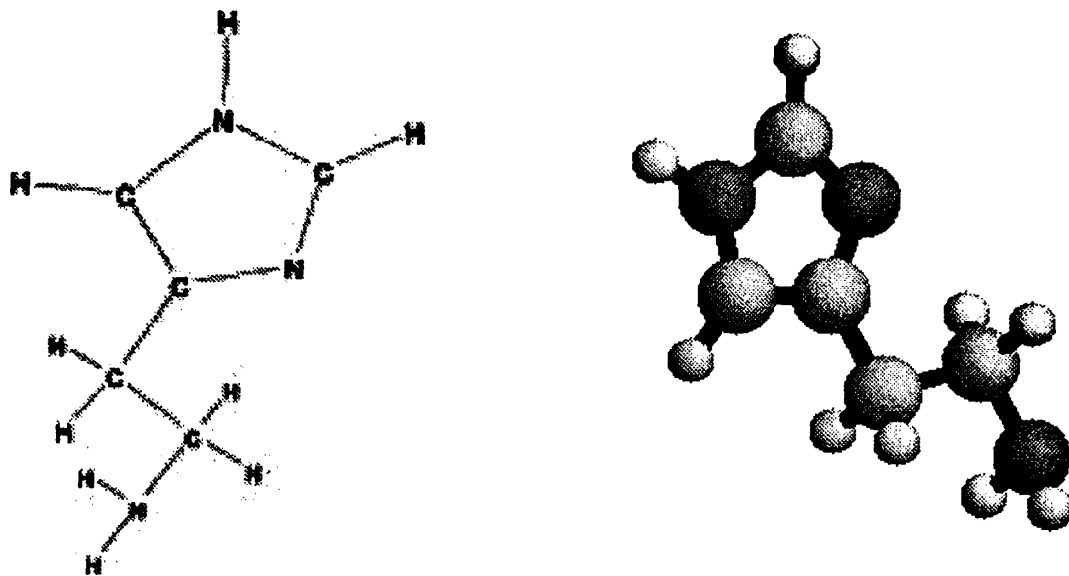
A.1.3.1. Ισταμίνη (χημεία – παραγωγή στα τρόφιμα)

Η ισταμίνη ή 2 (4 – ιμιδαζολυλο) – αιθυλαμίνη είναι μία υδρόφιλη ένωση που περιέχει έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο και μια αμινομάδα συνδεδεμένη με δυο μεθυλικές μονάδες (Brown και Roberts, 2001). Η αμινομεθυλική πλάγια άλυσος συνδέεται στο άτομο άνθρακα της θέσης



4 του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Η ισταμίνη βρίσκεται με τη μορφή του μονοκατιοντικού ταυτομερούς της σε pH 7,3 (Taylor και Eitenmiller, 1986).

Η δραστική μορφή της ισταμίνης για όλους τους υποδοχείς της είναι αυτή του μονοκατιοντικού $N_7 - H$ ταυτομερούς της (Ganellin και Parsons, 1982; Spasov και Chernikov, 2000).



Εικόνα 1. Γραφική και στερεοχημική απεικόνιση του μορίου της ισταμίνης

Η ισταμίνη κατατάσσεται στις βιογενείς αμίνες, οι οποίες είναι απλές αζωτούχες ενώσεις που παράγονται από την αποκαρβοξυλίωση των αντίστοιχων αμινοξέων ή την τρανσαμίνωση αλδευδών και κετονών. Με βάση τη χημική τους δομή οι βιογενείς αμίνες χωρίζονται στις αλειφατικές (πουτρεσκίνη, καδαβερίνη, σπερμίνη και σπερμιδίνη), στις αρωματικές (τυραμίνη και φαινυλαιθυλαμίνη) και στις ετεροκυκλικές (ισταμίνη και τρυπταμίνη) (Silla Santos, 1996).

Τα αμινοξέα από τα οποία προέρχονται οι αντίστοιχες αμίνες αναφέρονται στον Πίνακα 4.

Όλα τα τρόφιμα που περιέχουν πρωτεΐνες είναι δυνατόν να περιέχουν βιογενείς αμίνες (Suzzi και Gardini, 2003). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βιογενών αμινών από τα βακτήρια είναι η επάρκεια του αντίστοιχου αμινοξέος, ο κατάλληλος ενζυμικός εξοπλισμός του βακτηρίου και οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες που επιτρέπουν τη βακτηριακή ανάπτυξη, την παραγωγή βακτηριακών αποκαρβοξυλασών και την αποκαρβοξυλίωση του αμινοξέος (Silla – Santos, 1996).



Πίνακας 4. Πρόδρομα αμινοξέα και παράγωγες βιογενείς αμίνες

Αμινοξύ	Αμίνη
Ιστιδίνη	Ισταμίνη
Τυροσίνη	Τυραμίνη
Υδροξυτρυπτοφάνη	Σεροτονίνη
Λυσίνη	Καδαβερίνη
Ορνιθίνη	Πουτρεσκίνη
Αργινίνη	Σπερμίνη
Αργινίνη	Σπερμιδίνη

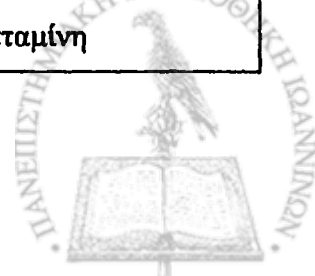
Σε τρόφιμα, όπως τα ψάρια, στα οποία δεν υπάρχει στάδιο ζυμώσεων κατά την παραγωγή τους, οι βιογενείς αμίνες αποτελούν δείκτη ανεπιθύμητης βακτηριακής ανάπτυξης. Η παρουσία βιογενών αμινών δεν είναι ανάλογη του μεγέθους της βακτηριακής ανάπτυξης (Silla Santos, 1996). Αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στο ότι η σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας δεν είναι πάντα η ίδια και τα βακτήρια που αναπτύσσονται δεν έχουν απαραίτητα την ίδια δυνατότητα παραγωγής αποκαρβοξυλασών. Επίσης η παραγωγή αμινών είναι μια διαδικασία συσσώρευσης που, εκτός από την παρουσία βακτηριακών αποκαρβοξυλασών, απαιτεί και την ύπαρξη των κατάλληλων αμινοξέων – υποστρωμάτων. Συνεπώς η ανίχνευση βιογενών αμινών σε αυτά τα τρόφιμα είναι ένας αξιόπιστος, αλλά ποιοτικός μόνο, δείκτης βακτηριακής επιμόλυνσης. Τα είδη των βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από διάφορα τρόφιμα στα οποία ανιχνεύθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις βιογενών αμινών αναφέρονται στον Πίνακα 5.

Αντίθετα, στα τρόφιμα που υφίστανται ζύμωση, η παραγωγή βιογενών αμινών γίνεται συνήθως με τη συνεργιστική δράση των βακτηρίων επιμόλυνσης και των βακτηρίων των οξυγαλακτικών καλλιιεργειών (Stratton και συν., 1991). Η παρασκευή αυτών των τροφίμων περιλαμβάνει τη χρήση μικροοργανισμών (Οξυγαλακτικά βακτήρια), η βιοχημική δραστηριότητα των οποίων προκαλεί τη ζύμωση. Οι διάφορες ζυμώσεις έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή τελικών προϊόντων που προσδίδουν αρεστά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, οσμή) στο τρόφιμο. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι δυνατόν να έχουν την ικανότητα παραγωγής και βιογενών αμινών (Silla – Santos, 1996). Η συντήρησή αυτών των τροφίμων για χρονικό διάστημα, που είναι δυνατόν να διαρκέσει έως και ένα

χρόνο, επιτρέπει στα βακτήρια να αναπτυχθούν, παράγοντας μικρές, αλλά διαρκώς σωρευόμενες ποσότητες βιογενών αμινών. Τέτοια τρόφιμα είναι διάφορα τυριά, τα αλλαντικά ωρίμανσης, το ξινολάχανο και τα κρασιά (Ten Brink και συν., 1990).

Πίνακας 5. Βιογενείς αμίνες και βακτήρια που απομονώθηκαν σε διάφορα τρόφιμα

Τρόφιμο	Βακτήρια	Βιογενείς αμίνες
Ψάρια	<i>Morganella morganii</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Clostridium perfringenes</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Staphylococcus xylosus</i>	Ισταμίνη Τυραμίνη Καδαβερίνη Πουτρεσκίνη Αγματίνη Σπερμίνη Σπερμιδίνη
Τυριά	<i>Lactobacillus buchneri</i> <i>Lactobacillus</i> 30a <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus arabinose</i> <i>Streptococcus faecium</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Bacillus macerans</i> <i>Propionibacteria</i>	Ισταμίνη Καδαβερίνη Πουτρεσκίνη Τυραμίνη β - φαινυλαιθυλαμίνη Τρυπταμίνη
Κρέας & κρεατοσκευάσματα	<i>Pediococcus</i> spp. <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp.	Ισταμίνη Καδαβερίνη Πουτρεσκίνη Τυραμίνη β - φαινυλαιθυλαμίνη Τρυπταμίνη



Πίνακας 5. (συνέχεια)

Τρόφιμο	Βακτήρια	Βιογενείς αμίνες
Λαχανικά τουρσί	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pediococcus</i> spp. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Ισταμίνη Καδαβερίνη Πουτρεσκίνη Τυραμίνη Τρυπταμίνη
Προϊόντα ζύμωσης από σόγια	<i>Rhizopus oligosporus</i> <i>Trichosporon beiglli</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Ισταμίνη Καδαβερίνη Πουτρεσκίνη Τυραμίνη Τρυπταμίνη

Πηγή: Shalaby, 1996.

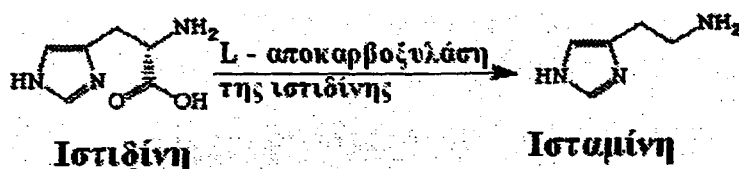
Πρέπει να σημειωθεί ότι οι βιογενείς αμίνες είναι θερμοάντοχες (Ten Brink και συν., 1990). Οι συνήθεις θερμοκρασίες θέρμανσης των τροφίμων δεν τις αδρανοποιούν, οπότε η βιολογική τους δράση παραμένει αναλλοίωτη, ακόμα και μετά από το ψήσιμο του τροφίμου. Μετά από θέρμανση σε θερμοκρασία αποστείρωσης ψαριού που περιείχε βιογενείς αμίνες, ανακτήθηκε το 90% αυτών (Shalaby, 1996). Εκτός των βιογενών αμινών και οι αποκαρβοξυλάσες που ευθύνονται για την παραγωγή τους εμφανίζουν αντοχή σε θερμοκρασίες παστερίωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να συνεχίζουν να παράγουν βιογενείς αμίνες στα τρόφιμα ακόμα και μετά την καταστροφή των βακτηρίων που τις παράγουν.

Η ισταμίνη, η τρυπταμίνη, η τυραμίνη και η β - φαινυλαιθυλαμίνη είναι αμίνες που έχουν σημαντικές φυσιολογικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Γενικά δρουν στον ψυχισμό και στα αγγεία του κυκλοφορικού συστήματος (Shalaby, 1996). Οι αμίνες δρουν ως νευροδιαβιβαστές στο νευρικό σύστημα και έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση μεταλλάξεων, μέσω της άμεσης ή έμμεσης παραγωγής νιτροζαμινών (Medina και συν., 1999). Εκτός της δηλητηρίασης από ισταμίνη και η κατανάλωση αυξημένων συγκεντρώσεων τυραμίνης προκαλεί νόσο με συμπτώματα υπερτασικής κρίσης. Η τυραμίνη δρα έμμεσα προκαλώντας την απελευθέρωση αδρεναλίνης από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, και άμεσα προκαλώντας νευρικά συμπτώματα, όπως διαστολή της κόρης του οφθαλμού, δακρύρροια, υπερέκκριση σιέλου, ταχύπνοια και αύξηση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα (Shalaby, 1996). Η διέλευση των τροφιμογενών αμινών στην κυκλοφορία του αίματος αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εκδήλωση της φαρμακολογικής τους δράσης.

Ισταμίνη (Φυσιολογία –Μεταβολισμός)

Η ισταμίνη απαντάται σε διάφορα ζώα, φυτά και βακτήρια καθώς και σε διάφορα δηλητήρια. Στα θηλαστικά βρίσκεται σε ποικίλες συγκεντρώσεις σχεδόν σε όλους τους ιστούς, στους οποίους αποθηκεύεται κυρίως στα σιτευτικά κύτταρα, ενώ στο αίμα αποθηκεύεται στα βασεόφιλα κοκκιοκύτταρα. Στους ιστούς η ισταμίνη βρίσκεται και σε άλλα κύτταρα, όπως οι νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος, τα επιδερμικά κύτταρα, τα κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου και γενικότερα σε κύτταρα ταχέως αναπτυσσόμενων ιστών.

Η ισταμίνη παράγεται φυσιολογικά στον οργανισμό με την αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης, η οποία πραγματοποιείται μέσω της L-αποκαρβοξυλάσης της ιστιδίνης. Η L-αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης χρησιμοποιεί ως συνένζυμο τη φωσφορική πυριδοξάλη και παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με την αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης των Gram αρνητικών βακτηρίων (Tanase και συν., 1985). Η αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης στον ανθρώπινο οργανισμό ανευρίσκεται κυρίως σε κύτταρα τα οποία συνθέτουν ισταμίνη, όπως τα σιτευτικά, οι ισταμινεργικοί νευρώνες και τα ομοιάζοντα προς τα εντεροχρωμαφινικά κύτταρα του εντέρου (Ortiz και συν., 2000).



Εικόνα 2. Σύνθεση της ισταμίνης

Η ισταμίνη καταβολίζεται με δύο οδούς. Η κυριότερη περιλαμβάνει τη μεθυλίωση του ιμιδαζολικού δακτυλίου μέσω της N – μεθυλοτρανσφεράσης της ισταμίνης (histamine – N-methyltransferase, HMT) και την παραγωγή της N – μεθυλισταμίνης. Στη συνέχεια η N – μεθυλισταμίνη μεταβολίζεται προς 1 – μέθυλο – ιμιδαζολο – 4 – οξικό οξύ με τη δράση της μονοαμινοοξειδάσης (MAO). Η δεύτερη οδός είναι η οξειδωτική απαμίνωση της ισταμίνης από το μη ειδικό ένζυμο διαμινοξειδάση (DAO). Τελικό προϊόν αυτής της διεργασίας είναι το ιμιδαζολοξικό οξύ το οποίο απεκκρίνεται είτε αυτούσιο είτε ως ριβοσίδιο. Η απέκκριση των μεταβολιτών της ισταμίνης γίνεται κυρίως με τα ούρα με κύριο απεκκρινόμενο μεταβολίτη το 1 – μέθυλο – ιμιδαζολο – 4 – οξικό οξύ (42 – 47%) (Μαρσέλος και Μάλαμας, 2004). Το κύριο όργανο στο οποίο μεταβολίζεται η ισταμίνη είναι το ήπαρ, όπου η ισταμίνη που



μεταφέρεται με την κυκλοφορία του αίματος αδρανοποιείται με αντιδράσεις οξείδωσης και μεθυλίωσης (Babe και Serafin, 1996).

Η ισταμίνη έχει τοπικές ή γενικευμένες επιδράσεις στη φυσιολογική λειτουργία των λείων μυϊκών ινών και των αδένων, δρώντας επάνω στους υποδοχείς της ισταμίνης. Οι υποδοχείς αυτοί χωρίζονται σε τρεις ομάδες, στους H_1 , H_2 και H_3 υποδοχείς (Leurs και συν., 1995; Spason και Chernikov, 2000). Η σύσπαση των βρόγχων και η συστολή του εντέρου αποδίδονται στη διέγερση των H_1 υποδοχέων (Ash και Schild, 1966), ενώ η γαστρική έκκριση αυξάνεται μέσω της διέγερσης των H_2 υποδοχέων. Ορισμένες δράσεις, όπως η προκαλούμενη υπόταση λόγω αγγειοδιαστολής, ρυθμίζονται τόσο από τους H_1 , όσο και από τους H_2 υποδοχείς.

Στους Πίνακες 6 και 7 αναφέρονται συνοπτικά οι εντοπίσεις των υποδοχέων ισταμίνης και οι επιδράσεις τους (Spason και Chernikov, 2000).

Πίνακας 6. Εντοπίσεις και δράσεις των H_1 και H_2 υποδοχέων

	Υποδοχείς	
	H_1	H_2
Βρόγχοι	Διάταση	Χάλαση
Αρτηρίδια	Χάλαση	Χάλαση
Αρτηρίες	Σύσπαση	
Καρδιά	Θετική ινοτρόπος δράση	Θετική χρονοτρόπος και ινοτρόπος δράση
Λεπτό έντερο	Σύσπαση	Χάλαση
ΚΝΣ	Καταστολή	Αναστολή ηλεκτρικής αγωγιμότητας μεταξύ νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού

Πίνακας 7. Εντοπίσεις και δράσεις των H_3 υποδοχέων

	H_3 Υποδοχείς
Κυκλοφορικό σύστημα	Μείωση αρτηριακής πίεσης και περιφερικής αντίστασης
Βρογχιόλια	Χάλαση
Στόμαχος	Μείωση της έκκρισης HCl, γαστρίνης και σωματοστατίνης
Είλεός	Αναστολή της νευρογενούς συσπαστικότητας
ΚΝΣ	Αναστολή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, διαταραχές μνήμης και μαθησιακών διεργασιών



A.1.3.2. Δράσεις της ενδογενούς ισταμίνης

Ο ρόλος της ισταμίνης στις αλλεργικές αντιδράσεις

Η ισταμίνη συμμετέχει στον μηχανισμό των αλλεργικών αντιδράσεων. Η είσοδος αλλεργιογόνων στον οργανισμό προκαλεί την παραγωγή ειδικών IgE αντισωμάτων που συνδέονται με μεγάλη συγγένεια σε επίτοπους της επιφάνειας των σιτευτικών κυττάρων και των βασικών κοκκιοκυττάρων. Τα αντισώματα λειτουργούν ως γέφυρες μεταξύ του αντιγόνου και του κυττάρου – στόχου. Η σύνδεση των αντισωμάτων στην επιφάνεια των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca^{2+} μέσω της ενεργοποίησης κινασών της τυροσίνης, τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών (μεταξύ των οποίων και οι φωσφολιπάσες $C_{\gamma}1$ και $C_{\gamma}2$) και το μεταβολισμό των φωσφατιδυλοϊνositολών. Η αύξηση αυτή του ενδοκυτταρικού ασβεστίου προκαλεί την εξωκύστωση των εκκριτικών κυστιδίων και την ελευθέρωση της περιεχόμενης ισταμίνης και των άλλων ενώσεων (φωσφολιπάση A_2 , παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, λευκοτριένια D_4 , κινίνες) στο εξωκυτταρικό περιβάλλον (Babe και Serafin, 1996).

Η ενδοφλέβια έγχυση ποικίλων ουσιών, μεταξύ των οποίων και θεραπευτικές ουσίες, είναι δυνατόν να προκαλέσει την απελευθέρωση ισταμίνης από τα σιτευτικά κύτταρα. Αυτές οι ενώσεις είναι συνήθως οργανικές βάσεις και περιλαμβάνουν αμίδια, αμιδίνες, τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου, πιπεριδίνες, αλκαλοειδή και βασικά αντιβιοτικά. Όλες προκαλούν έκκριση ισταμίνης μέσω της αύξησης της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ασβεστίου. Ορισμένες από αυτές είναι ιοντοφόρα που μεταφέρουν Ca^{2+} . Άλλες, όπως οι αναφυλατοξίνες, είναι ειδικά αντιγόνα που συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη των σιτευτικών κυττάρων και προκαλούν την αύξηση της διαπερατότητας αυτής στα ιόντα Ca^{2+} . Η μαστοπαράνη (πεπτίδιο που βρίσκεται στο δηλητήριο της σφήκας) διεγείρει τις G – ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυττάρου οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C (Higashijima και συν., 1988). Τέλος, ουσίες, όπως η πολυμυξίνη B, προκαλούν την απελευθέρωση Ca^{2+} μέσω της απευθείας ενεργοποίησης των ενδοκυτταρικών αποθηκών ασβεστίου (Lagunoff και συν., 1983).

Επίδραση στο Κυκλοφορικό σύστημα

Η ισταμίνη προκαλεί αγγειοδιαστολή των μικρών αγγείων με αποτέλεσμα τη μείωση της περιφερικής αντίστασης στη ροή του αίματος, την υπόταση και την εμφάνιση



ερυθημάτων στο δέρμα. Επίσης η ισταμίνη αυξάνει τη διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων (Babe και Serafin, 1996).

Η περιφερική αγγειοδιαστολή επιτυγχάνεται μέσω της διέγερσης τόσο των H_1 όσο και των H_2 υποδοχέων. Η ισταμίνη έχει μεγαλύτερη συγγένεια προς τους H_1 υποδοχείς των οποίων η διέγερση προκαλεί ταχεία αγγειοδιαστολή, μικρής όμως χρονικής διάρκειας. Η διέγερση των H_2 υποδοχέων προκαλεί βραδύτερη αγγειοδιαστολή, που παρατείνεται όμως για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών προκαλεί την εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος, την αύξηση της ροής της λέμφου και την πρόκληση τοπικών οιδημάτων. Αντίθετα, στα μεγάλα αγγεία η ισταμίνη προκαλεί αγγειοσυστολή. Η υπερδοσία ισταμίνης προκαλεί κυκλοφορική καταπληξία που μοιάζει αρκετά με τη χειρουργική και τραυματική καταπληξία. Τέλος, η ισταμίνη προκαλεί ινοτρόπο και χρονοτρόπο αύξηση της καρδιακής συστολής μέσω της απελευθέρωσης ιόντων Ca^{2+} .

Επίδραση στις Λείες μυϊκές ίνες

Ανάλογα με την ενεργοποίηση των κατάλληλων υποδοχέων, η ισταμίνη προκαλεί σύσπαση ή χάλαση των λείων μυϊκών ινών. Η ενεργοποίηση των H_1 υποδοχέων προκαλεί σύσπαση των λείων μυϊκών ινών, ενώ η ενεργοποίηση των H_2 υποδοχέων προκαλεί χάλαση. Ιδιαίτερα ευαίσθητος είναι ο λείος μυς των βρόγχων, όπου η ισταμίνη προκαλεί συστολή του (Babe και Serafin, 1996).

Επίδραση στη Γαστρική έκκριση

Η ισταμίνη αυξάνει τη γαστρική έκκριση ιόντων Cl^- (Blacwell και συν., 1972). Η δράση της ρυθμίζεται από την παρουσία των υποδοχέων της στο στόμαχο. Οι δράσεις των υποδοχέων είναι ανταγωνιστικές, με τους H_2 υποδοχείς να αυξάνουν τη γαστρική έκκριση από τα οξυντικά κύτταρα. Οι υποδοχείς ισταμίνης, κατά κύριο λόγο εντοπίζονται στα προσομοιάζοντα με τα εντεροχρωμαφινικά κύτταρα του στομάχου (ECL cells), τα οποία δρουν ως διαμεσολαβητές του ορμονικού σήματος και της έκκρισης. Οι H_3 υποδοχείς έχουν ρόλο αυτορύθμισης της συγκέντρωσης της τοπικά παραγόμενης ισταμίνης (Barocelli και Ballabeni, 2003).

A.1.3.3. Δράσεις της εξωγενούς (τροφιμογενούς) ισταμίνης

Παρότι υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις για την ενοχοποίηση της ισταμίνης ως αιτιολογικού παράγοντα της σκομβροτοξικής δηλητηρίασης, δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση



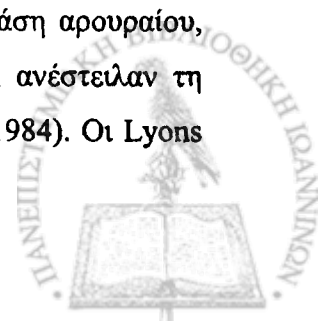
μεταξύ χορηγούμενης *per os* ποσότητας ισταμίνης και της δριμύτητας των συμπτωμάτων. Τα αποτελέσματα των διαφόρων ερευνών μετά από χορήγηση ισταμίνης σε ανθρώπους δίνουν συγκεχυμένα αποτελέσματα, λόγω κυρίως της εξέτασης ποικίλων παραμέτρων (Lehane και Olley, 2000).

Οι Weis και συν. (1932, βιβλιογραφική αναφορά του Halstead, 1967) βρήκαν ότι η χορήγηση *per os* 180 mg φωσφορικής ισταμίνης δεν προκάλεσε την εκδήλωση συμπτωμάτων σε ανθρώπους, ενώ η ενδοφλέβια χορήγηση 7 μg φωσφορικής ισταμίνης προκάλεσε αγγειοδιαστολή και αύξηση του καρδιακού ρυθμού. Ο Granerus (1968) αναφέρει ότι, μετά από χορήγηση *per os* 68,5 mg ισταμίνης δεν παρατηρήθηκε κανένα σύμπτωμα τοξίκωσης. Οι Clifford και συν. (1989) χορήγησαν σε πειραματική ομάδα εθελοντών 50 g τόννου, στον οποίο πρόσθεσαν 300 mg ισταμίνης. Τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν ήταν μικρής έντασης και περιλάμβαναν μούδιασμα στη στοματική κοιλότητα, κεφαλαλγίες και ερύθημα στο πρόσωπο.

Οι Bartholomew και συν. (1987), σε ανασκόπηση 258 περιστατικών δηλητηρίασης από ισταμίνη στη Βρετανία, αναφέρουν ότι οι περισσότερες περιπτώσεις προκλήθηκαν αποκλειστικά από την κατανάλωση προσχηματισμένης ισταμίνης. Όμως θεωρούν ότι, πιθανόν στις περιπτώσεις στις οποίες τα συμπτώματα δεν ήταν τυπικά του συνδρόμου, να εμπλεκόταν και άλλες τοξίνες εκτός της ισταμίνης. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι στο 94% των περιστατικών, στα οποία το εμπλεκόμενο ψάρι περιείχε συγκέντρωση ισταμίνης μεγαλύτερη των 20 mg/100 g τα συμπτώματα ήταν χαρακτηριστικά. Όταν όμως η συγκέντρωση ισταμίνης ήταν μεταξύ των 5 και 20 mg/100 g, μόνο το 38% των περιστατικών εμφάνισε τα χαρακτηριστικά συμπτώματα του συνδρόμου. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι ακόμα και δείγματα ψαριών που περιείχαν συγκέντρωση ισταμίνης <5 mg/100 g, προκάλεσαν σε ορισμένους ασθενείς συμπτώματα χαρακτηριστικά της δηλητηρίασης από ισταμίνη.

Αρκετοί ερευνητές πρότειναν την ύπαρξη ενώσεων στα αλλοιωμένα ψάρια οι οποίες δρουν συνεργικά με την ισταμίνη στην εκδήλωση τοξικής δράσης στον άνθρωπο (Bjeldanes και συν., 1978· Lerke και συν. 1978· Taylor και συν., 1984; Hui και Taylor, 1985). Οι ενώσεις αυτές δρουν μέσω της μείωσης της ελάχιστης απαιτούμενης δόσης ισταμίνης για την εκδήλωση της νόσου.

Όταν εξετάστηκε η δράση 38 χημικών ενώσεων (κυρίως αζωτούχων βάσεων) που ανιχνεύονται σε αλλοιωμένο τόννο μαζί με την ισταμίνη, σε σχέση με την *in vivo* δράση τους στην ειλεακή N – μεθυλοτρανσφεράση της ισταμίνης και στη διαμινοξειδάση αρουραίου, βρέθηκε ότι κάποιες ενώσεις, όπως η καδαβερίνη και η αμινογουανιδίνη, ανέστειλαν τη δράση των δύο αυτών ένζυμων (Taylor και Lieber, 1979· Taylor και συν., 1984). Οι Lyons



και συν. (1983) έδειξαν ότι η καδαβερίνη και η αμινογουανιδίνη αυξάνουν την εντερική απορρόφηση της ισταμίνης σε τμήματα λεπτού εντέρου αρουραίου, αποτρέποντας το μεταβολισμό της σε λιγότερα τοξικά παράγωγα. Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν αναφορές ανεύρεσης της αμινογουανιδίνης σε ψάρια σε αποσύνθεση.

Οι Parrot και Nicot (1966) αναφέρουν ότι η τοξικότητα της ισταμίνης αυξήθηκε κατά 10 φορές σε ινδικά χοιρίδια όταν χορηγήθηκε 40 λεπτά μετά από τη χορήγηση πουτρεσκίνης. Η αναλογία ισταμίνης προς πουτρεσκίνη που χορηγήθηκε ήταν 1:5, σε αντίθεση με την αναλογία που βρίσκεται σε ψάρια σε αποσύνθεση που συνήθως κυμαίνεται στο 100:1.

Οι Bjeldanes και συν. (1978) διαπίστωσαν αύξηση τοξικότητας σε ινδικά χοιρίδια όταν η ισταμίνη χορηγήθηκε ταυτόχρονα με καδαβερίνη. Η αναλογία ισταμίνης προς καδαβερίνη που απαιτείται για την εκδήλωση της συνεργικής δράσης πρέπει να είναι μικρότερη από 5:1, άποψη που συμφωνεί με την αναλογία των δύο αμινών σε ψάρια σε αποσύνθεση, η οποία είναι περίπου 10:1.

Άλλες βιογενείς αμίνες που θεωρούνται ότι είναι δυνατόν να δράσουν συνεργικά στην εκδήλωση του συνδρόμου είναι η τυραμίνη (αναστολέας της μονοαμινοξειδάσης, προκαλεί αύξηση της αρτηριακής πίεσης), η τρυπταμίνη (αναστολέας της διαμινοξειδάσης) και η β - φαινυλαιθυλαμίνη (αναστολέας της διαμινοξειδάσης και της N - μεθυλοτρανσφεράσης της ισταμίνης) (Stratton και συν., 1991).

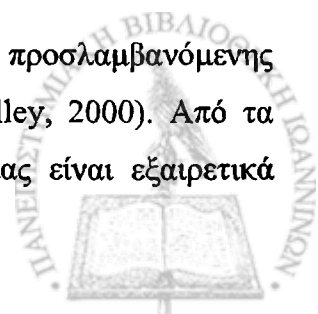
Οι Arnold και Brown (1978) προτείνουν την απενοχοποίηση της προσχηματισμένης τοξίνης στο τρόφιμο και την εμπλοκή και άλλων ουσιών που παράγονται στα αλλοιωμένα ψάρια ως αίτια της εκδήλωσης του συνδρόμου. Την άποψη αυτή συμμερίζονται και άλλοι ερευνητές.

Το ουροκανικό οξύ, ένωση που ανευρίσκεται στα αλλοιωμένα ψάρια (Baranowski, 1985a), προκαλεί την παραγωγή ισταμίνης *in vivo* σε ποντίκια (Hart και συν., 1997) και η *cis*-ισομερής μορφή του αποτελεί παράγοντα αποκοκκίωσης των σιτευτικών κυττάρων (Wille και συν., 1999).

A.1.3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση των συμπτωμάτων της δηλητηρίασης από ισταμίνη

Ατομική ευαισθησία

Η δριμύτητα των συμπτωμάτων εξαρτάται από την ποσότητα της προσλαμβανόμενης τοξίνης και από την ευαισθησία του ατόμου σε αυτή (Lehane και Olley, 2000). Από τα διάφορα πειραματικά δεδομένα φαίνεται ότι το εύρος της ευαισθησίας είναι εξαιρετικά



μεγάλο. Οι Motil και Schrimshaw (1979) χορήγησαν σε δύο πειραματικές ομάδες των τεσσάρων και οκτώ ατόμων αντίστοιχα, στη μία ομάδα χυμό γκρέιπφρουτ και στην άλλη 100 g άριστης ποιότητας τόννο, που περιείχαν 100 – 180 mg ισταμίνης. Μόνο το ένα από τα τέσσερα και τα δύο από τα οκτώ άτομα της αντίστοιχης πειραματικής ομάδας παρουσίασαν ελαφρά συμπτώματα τοξίκωσης από ισταμίνη.

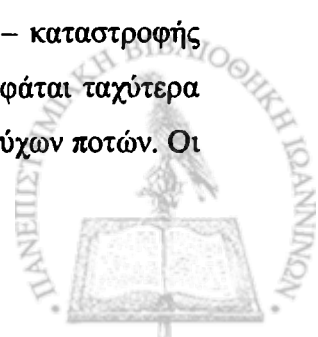
Σύμφωνα με τους Taylor και συν. (1989), η αναλογία προσβολής στις επιδημικές εξάρσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη είναι από 50% έως 100%. Σε πείραμα των Van Gelderen και συν. (1992) μόνο δύο άτομα θηλυκού γένους από τα οκτώ της ομάδας εθελοντών παρουσίασαν συμπτώματα, μετά την κατανάλωση αλλοιωμένου ψαριού που περιείχε 90 mg ισταμίνης. Η συγκέντρωση ισταμίνης στο πλάσμα αίματος των δύο αυτών ατόμων δεν ήταν μεγαλύτερη από αυτή των άλλων ατόμων.

Οι Ijomah και συν. (1991) χρησιμοποίησαν ομάδα εθελοντών στους οποίους χορηγήθηκε αλλοιωμένο σκουμπρί. Διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν εθελοντές ευαίσθητοι και άλλοι ανθεκτικοί στην κατανάλωση σκουμπριού και ότι η τοξικότητα των ψαριών δεν σχετιζόταν με τις συγκεντρώσεις ισταμίνης σε αυτά. Όταν στους εθελοντές χορηγήθηκε Η₁ – αναστολέας ή φαρμακευτική αγωγή placebo, η διάρροια και ο έμετος σταμάτησαν. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η προσχηματισμένη ισταμίνη στο ψάρι έπαιζε δευτερεύοντα ρόλο και ότι υπάρχει άγνωστος παράγοντας που προκαλεί την αποκοκκίωση των σιτευτικών κυττάρων και την εκδήλωση των συμπτωμάτων.

Οι Sánchez – Guerrero και συν. (1997) μέτρησαν τα επίπεδα τρυπτάσης σε επτά άτομα που νόσησαν από δηλητηρίαση από σκομβροειδείς ιχθείς. Η συγκέντρωση της τρυπτάσης *in vivo* αποτελεί έναν αξιόπιστο ποσοτικό δείκτη της αποκοκκίωσης των σιτευτικών κυττάρων, αφού το ένζυμο περιέχεται στα εκκριτικά κυστίδια των σιτευτικών κυττάρων και απελευθερώνεται ταυτόχρονα με την ισταμίνη. Τα επίπεδα τρυπτάσης που μετρήθηκαν οδήγησαν τους συγγραφείς στο συμπέρασμα ότι το σύνδρομο δεν οφείλεται σε αντίδραση υπερευαισθησίας.

Διατροφικές συνθήκες

Ο Geiger (1955) διατύπωσε την υπόθεση ότι οι διαφορετικές συνθήκες στο γαστρεντερικό σωλήνα που προκαλούνται από την κατανάλωση αλλοιωμένων ψαριών, τα οποία συνοδεύονται από καυτή σάλτσα ή από αλκοολούχα ποτά, είναι δυνατόν να αυξήσουν την απορρόφηση της ισταμίνης, διαταράσσοντας το ισοζύγιο απορρόφησης – καταστροφής της. Οι Zee και συν. (1981) επίσης θεωρούν ότι η ισταμίνη πιθανώς απορροφάται ταχύτερα και έχει αυξημένη βιολογική δράση με την ταυτόχρονη κατανάλωση αλκοολούχων ποτών. Οι



Mitchell και Code (1954) αναφέρουν ότι η ισταμίνη απορροφάται ταχύτερα όταν προσλαμβάνεται με τροφή (ψωμί, βούτυρο και γάλα) από ότι όταν προσλαμβάνεται μόνη της.

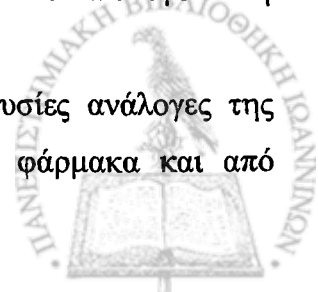
Οι Johnson και Overholt (1967) παρατήρησαν σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης ισταμίνης στο φλεβικό αίμα σκύλων των οποίων ο στόμαχος περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις οξικού οξέος. Πρότειναν ότι το οξικό οξύ που υπάρχει στο λεμόνι ή στο ξίδι που προστίθεται στα ψάρια, είναι δυνατόν να αυξάνει την απορρόφηση της ισταμίνης. Τα οξέα του λεμονιού ή του ξιδιού είναι δυνατόν να επηρεάζουν το pH του γαστρεντερικού σωλήνα, αναστέλλοντας έτσι τη δράση των ένζυμων που καταβολίζουν την ισταμίνη.

Επειδή οι βιογενείς αμίνες, όπως η ισταμίνη, η καδαβερίνη, η πουτρεσκίνη και η τυραμίνη, βρίσκονται σε σημαντικές συγκεντρώσεις και σε άλλα τρόφιμα, π.χ. κρέας, αλλαντικά, τυριά, ξινολάχανο, μπίρα, κρασί (Shalaby, 1996), κινέζικα εδέσματα, όπως η σάλτσα σόγιας (Chin και συν., 1989), η ταυτόχρονη κατανάλωση τέτοιων τροφίμων με ψάρια, είναι δυνατόν να προκαλέσουν την εκδήλωση του συνδρόμου, λόγω της αθροιστικής δράσης της ισταμίνης και των άλλων αμινών.

Φαρμακευτικές αγωγές

Ορισμένα φάρμακα αναστέλλουν τη δράση των ένζυμων που μεταβολίζουν την ισταμίνη και είναι δυνατόν να προκαλέσουν την εκδήλωση συμπτωμάτων όταν χορηγούνται μαζί με τρόφιμα που περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις ισταμίνης (Taylor και Eittenmiller, 1986· Chin και συν., 1989). Οι Hui και Taylor (1985) μελέτησαν τη δράση τροφιμογενών και φαρμακολογικών αναστολέων των ένζυμων που μεταβολίζουν την ισταμίνη. Στη συγκεκριμένη εργασία παρακολούθησαν τον μεταβολισμό σημασμένης με ^{14}C ισταμίνης σε αρουραίους. Το 80% της συνολικά χορηγούμενης σημασμένης ισταμίνης απεκκρίνονταν εντός 24 ωρών με τα ούρα, ενώ το 10% απεκκρίνονταν με τα κόπρανα. Σε ανάλυση ούρων 4 ώρες μετά τη χορήγηση, ο κυριότερος μεταβολίτης ήταν το ιμιδαζολακετοξικό οξύ, ενώ η μη μεταβολισμένη ισταμίνη ανερχόταν στο 19%. Η χορήγηση αμινογουανιδίνης, φαινυλαιθυλαμίνης, τυραμίνης και ισονιαζίδης προκάλεσε την αύξηση του ποσοστού της μη μεταβολισμένης ισταμίνης στα ούρα στο 61%, 70%, 52% και 42% αντίστοιχα. Επίσης η χορήγηση καδαβερίνης σε αναλογία μεγαλύτερης του 4:1 προκάλεσε την αύξηση της μη μεταβολισμένης ισταμίνης. Αντίθετα η χορήγηση πουτρεσκίνης δεν έφερε κανένα αποτέλεσμα. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι τα αποτελέσματά τους δεν δικαιολογούν τη συμμετοχή των δύο αυτών αμινών στην εκδήλωση της νόσου.

Η N – μεθυλοτρανσφεράση της ισταμίνης αναστέλλεται από ουσίες ανάλογες της μεθυλμεθειονίνης, όπως η αδενосуκτυεΐνη, από αντιπλασμοδικά φάρμακα και από



διάφορους αγωνιστές και ανταγωνιστές των υποδοχέων της ισταμίνης (Lehane και Olley, 2000). Ορισμένα αντισταμινικά φάρμακα και η αμινογουανιδίνη είναι αναστολείς της διαμινοξειδάσης. Διάφορες ενώσεις που είναι ειδικοί αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης εμφανίζουν και ανασταλτική δράση στη διαμινοξειδάση. Σε αυτές τις ουσίες κατατάσσεται και η ισονιαζίδη. Πρόκειται για φάρμακο που χρησιμοποιείται στη θεραπεία της φυματίωσης και έχει ενοχοποιηθεί ως σημαντικός παράγοντας στην εκδήλωση της δηλητηρίασης από ισταμίνη (Taylor και Eittenmiler, 1986; Stratton και συν., 1991). Οι Chin και συν. (1989) και οι Stratton και Taylor (1991) έχουν επισημάνει συγκεκριμένα φάρμακα τα οποία δρουν συνεργικά στην εκδήλωση του συνδρόμου. Οι Kahana και Todd (1981) αναφέρουν περιστατικό δηλητηρίασης από σκομβροειδείς ιχθείς σε άτομο που βρισκόταν σε θεραπεία με ισονιαζίδη.

Προϋπάρχουσες νόσοι και ηλικία

Ο μεταβολισμός της ιστιδίνης είναι δυνατόν να επηρεαστεί από ορισμένες ασθένειες. Η ιστιδιναιμία, μία κληρονομική νόσος που οφείλεται στην έλλειψη της αμμωνιακής λυάσης της ιστιδίνης (HAL) (Levy, 2002), προκαλεί αυξημένη απέκκριση της ισταμίνης και των μεταβολιτών της. Ασθενείς που παρουσιάζουν τη νόσο ή παρουσιάζουν μεταβολές στο μεταβολισμό της ισταμίνης είναι δυνατόν να είναι περισσότερο ευαίσθητοι στη δράση της ισταμίνης. Η εξωγενής ισταμίνη είναι δυνατόν επίσης να επιδεινώσει καταστάσεις στις οποίες η ενδογενής ισταμίνη είναι αυξημένη, όπως οι αλλεργίες και η μαστοκύττωση (Taylor και Eittenmiler, 1986). Εκτός αυτών, με την πάροδο της ηλικίας μειώνεται η παραγωγή των ένζυμων που μεταβολίζουν την ισταμίνη, με αποτέλεσμα τα ηλικιωμένα άτομα να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στη νόσο (Lehane και Olley, 2000).

A.1.4. Τρόφιμα που ευθύνονται για δηλητηρίαση από ισταμίνη

A.1.4.1. Ψάρια

Τα ψάρια που έχουν ενοχοποιηθεί περισσότερο για την πρόκληση δηλητηριάσεων από ισταμίνη ανήκουν στις οικογένειες των *Scombridae* και *Scomberosocidae*. Συγκεκριμένα πρόκειται για λιπαρά ψάρια όπως τα σκουμπριά (*Scomber spp.*), οι τόννοι (*Thunnus spp.*), οι παλαμίδες (*Katsuwonus pelamis*, *Sarda spp.*), οι σαρδέλες (*Sardina pilchardus*, *Sardinella spp.*), ο γαύρος (*Engraulis spp.*), οι ρέγγες (*Clupea spp.*), και τα γοφάρια (*Pomatomus spp.*).



Εκτός αυτών και άλλα ψάρια, που δεν ανήκουν στις παραπάνω οικογένειες, έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση δηλητηρίασης από ισταμίνη. Στον Πίνακα 8 αναφέρονται τα είδη ψαριών που έχουν κατά καιρούς προκαλέσει δηλητηρίαση από ισταμίνη (Taylor και Eitenmiller, 1986 Παπαδοπούλου, 2001).

Πίνακας 8. Ψάρια που έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση δηλητηρίασης από ισταμίνη

Όνομα	Οικογένεια	Γένος / Είδος	
Τόννος κιτρινόπτερος	<i>Scombridae</i>	<i>Thunnus albacares</i>	
Τόννος μαυρόπτερος		<i>Thunnus atlanticus</i>	
Τόννος κόκκινος		<i>Thunnus thynnus thynnus / T. maccoyii</i>	
Τόννος μεγαλομάτης	<i>Scombridae</i>	<i>Parathunnus mebachi</i>	
Longtail tuna		<i>Thunnus tonggol</i>	
Τόννος μακρόπτερος		<i>Thunnus albacore</i>	
Παλαμίδα		<i>Euthynnus (Katsuwonus) pelamis</i>	
Τονάκι Ειρηνικού		<i>Euthynnus affinis</i>	
Τονάκι Ατλαντικού		<i>Euthynnus alleteratus</i>	
Black skipjack		<i>Euthynnus lineatus</i>	
Slender tuna		<i>Allothunnus fallai</i>	
Κοπάνι		<i>Allothunnus thazard</i>	
Παλαμίδα σάρδα		<i>Sarda sarda</i>	
Παλαμίδα ανατολής		<i>Sarda orientalis</i>	
Παλαμίδα Χιλής		<i>Sarda chilensis</i>	
Παλαμίδα αυστραλέζικη		<i>Sarda australis</i>	
Σκουμπρί		<i>Scombridae</i>	<i>Scomber scombrus</i>
Κολιός			<i>Scomber japonicus</i>
Σκουμπρί βασιλικό	<i>Scomberomus cavalla / Sc. regalis</i>		
Σκουμπρί κιτρινόστικτο	<i>Scomber maculatus</i>		
Σκουμπρί Ισπανικό	<i>Scomber concolor</i>		
Βελονίδα	<i>Scomberosocidae</i>	<i>Scomberosox saurus</i>	
Βελονίδα Ειρηνικού		<i>Cololabis saira</i>	
Γοφάρι	<i>Pomatomidae</i>	<i>Pomatomus salatrix</i>	



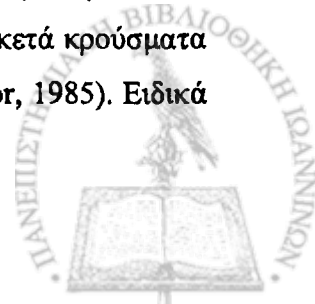
Πίνακας 8. (συνέχεια)

Όνομα	Οικογένεια	Γένος / Είδος
Κορυφαίνα ή mahi – mahi	<i>Coryphaenidae</i>	<i>Coryphaena hippurus</i>
Σαφρίδι Ιαπωνικό	<i>Carangidae</i>	<i>Trachurus trachurus / T. japonicus</i>
Σαφρίδι Καλιφόρνιας	<i>Carangidae</i>	<i>Trachurus symmetricus</i>
Μαγιάτικο Ειρηνικού		<i>Seriola colburni</i>
Σεριόλα		<i>Seriola dorsalis / S. grandis</i>
Μαγιάτικο		<i>Seriola dumerili</i>
Ρέγγα	<i>Clupeidae</i>	<i>Clupea harengus harengus</i>
Ρέγγα Ειρηνικού		<i>Clupea harengus pallasii</i>
Παπαλίνα		<i>Clupea sprattus</i>
Σαρδέλα		<i>Sardina pilchardus</i>
Σαρδέλα ΝΔ Ειρηνικού		<i>Sardinops sagax</i>
Φρίσσα		<i>Sardinella aurita</i>
Σαρδέλα Ισπανική		<i>Sardinella anchovia</i>
Γαύρος	<i>Engraulidae</i>	<i>Engraulis encrasicolus</i>
Γαύρος Ειρηνικού	<i>Engraulidae</i>	<i>Engraulis mordax</i>
Αντσοβέτα		<i>Centengraulis mysticetus</i>

Πηγή Ελληνικών ονομασιών: Παπαναστασίου, 1990

Τα ψάρια που έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση δηλητηρίασης από ισταμίνη διαβιούν σχεδόν αποκλειστικά στο θαλάσσιο περιβάλλον (Taylor και Eitenmiller, 1986). Στις Η.Π.Α. η κορυφαίνα αποτελεί το συχνότερα εμπλεκόμενο ψάρι. Σε άλλες χώρες αντιθέτως κρούσματα δηλητηρίασης από κορυφαίνα έχουν αναφερθεί μόνο σποραδικά σε Καναδά (Bowmer και συν., 1979), Βερμούδες (Dickinson, 1982) και Ιαπωνία, γεγονός που οφείλεται μάλλον στη μικρότερη κατανάλωσή του ψαριού σε αυτές τις χώρες.

Οι σαρδέλες έχουν ενοχοποιηθεί σε κρούσματα στη Γερμανία (Schulze και συν., 1979), Βρετανία και Ιαπωνία (Taylor και Eitenmiller, 1986). Παρότι η κατανάλωση σαρδέλων στις Η.Π.Α. και στις Σκανδιναβικές χώρες είναι σημαντική, δεν έχουν αναφερθεί κρούσματα από το συγκεκριμένο ψάρι σε αυτές τις χώρες. Στη Βρετανία έχουν αναφερθεί αρκετά κρούσματα από κατανάλωση ψαριών συγγενικών με τις σαρδέλες, όπως οι ρέγγες (Taylor, 1985). Ειδικά



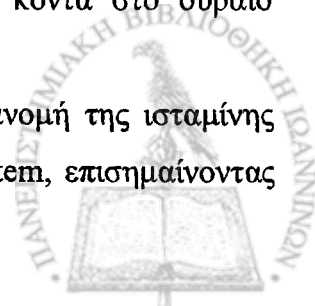
σε αλίπαστες ρέγγες με αλάτι και ζάχαρη. έχουν αναφερθεί αυξημένα επίπεδα ισταμίνης, χωρίς όμως να έχουν ενοχοποιηθεί για πρόκληση τροφοδηλητηρίασης (Taylor, 1985).

Η παραγωγή ισταμίνης στη σάρκα των ψαριών γίνεται μέσω της μικροβιακής αποκαρβοξυλίωσης της ιστιδίνης. Η συγκέντρωση ιστιδίνης στη σάρκα των ψαριών επηρεάζει άμεσα τη δυνατότητα παραγωγής ισταμίνης σε αυτά (Pan, 1985). Η συγκέντρωση της ελεύθερης ιστιδίνης είναι μεγαλύτερη στα μεταναστευτικά ψάρια, στα λιπαρά ψάρια και στα ερυθρά ψάρια, ενώ στα λευκά ψάρια η συγκέντρωση ελεύθερης ιστιδίνης είναι μικρότερη από αυτή των ερυθρών. (Love, 1980; Lehane και Olley, 2000).

Τα ψάρια διακρίνονται σε λευκά και σε ερυθρά με βάση την αναλογία των λευκών ή ερυθρών μυϊκών ινιδίων των γραμμωτών μυών. Οι Takagi και συν. (1969) βρήκαν ότι η συγκέντρωση ιστιδίνης σε λευκά ψάρια (*Sebastes vulpes*, *Sebastolobus macrochir*, *Lipidotrigla microptera*, *Ditrema temmincki* και *Hypomessus japonicus*) ήταν μικρότερη από 38,2 mg/100 g, σε ενδιάμεσου χρώματος ψάρια (*Hemiramphus sajori*, *Trachurus japonicus*, *Konosirus punctatus*, *Clupea pallasii*, *Paralichthys olivaceous*, *Limanda herzensteini* και *Kareius bicoloratus*) η συγκέντρωση ιστιδίνης ήταν επίσης μικρή, ενώ σε ερυθρά ψάρια (*Sardinops melanosticta*, *Engraulis japonica*, *Cololabis saira*, *Seriola quinqueradiata* και *Scomber japonicus*) η συγκέντρωση ιστιδίνης βρισκόταν μεταξύ των 484 και 1098 mg/100 g. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα ερυθρά ψάρια ανιχνεύτηκε συγκέντρωση ισταμίνης μεταξύ 70 και 263 mg/100 g ισταμίνης μετά από αποθήκευση στους 25°C για 24 h (Mackie και Richie, 1974; Orejana και συν., 1983).

Επίσης η συγκέντρωση ισταμίνης ποικίλλει στα διάφορα τμήματα του ίδιου ψαριού. Συνήθως είναι μεγαλύτερη σε ιστούς που γειτνιάζουν με τα βράγχια και την κοιλιακή κοιλότητα (Lerke και συν., 1978). Σε πείραμα των Lerke και συν. (1978) εξετάστηκαν δείγματα από 12 διαφορετικά τμήματα ενός τόννου. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι η κατανομή της παραγόμενης ισταμίνης σχετίζεται με την βακτηριακή επιμόλυνση του κάθε τμήματος του ψαριού και ότι είναι εντελώς άνιση, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση ισταμίνης να είναι έως και τέσσερις φορές μεγαλύτερη σε περιοχές που απέχουν μόλις 3 cm μεταξύ τους. Πάντως τα εδώδιμα τμήματα του ψαριού που βρίσκονται κοντά στην κοιλιακή κοιλότητα φαίνεται να περιέχουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ισταμίνης. Την ίδια παρατήρηση έκαναν και οι Frank και συν. (1981) οι οποίοι παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση ισταμίνης κλιμακώνεται από μεγάλη κοντά στα βράγχια έως μικρή κοντά στο ουραίο πτερύγιο.

Οι Yoshinaga και Frank (1982) απέδωσαν την ανομοιογενή κατανομή της ισταμίνης στην άνιση κατανομή των βακτηρίων στη σάρκα του ψαριού post mortem, επισημαίνοντας



όμως ότι η συγκέντρωση ιστιδίνης στα διάφορα τμήματα του τόννου είναι σχεδόν η ίδια. Οι Hardy και Smith (1976) με πειράματά τους έδειξαν ότι η συγκέντρωση ισταμίνης σε απεντερωμένους τόννους ήταν 10 φορές μικρότερη από τη συγκέντρωση σε ολόκληρους τόννους μετά από συντήρηση των ψαριών σε θερμοκρασία δωματίου για 140 h.

A.1.4.1.1. Παραγωγή ισταμίνης στα ψάρια

Κλιματολογικές συνθήκες

Σύμφωνα με την Pan (1985), η εποχή και η θερμοκρασία των νερών αλίευσης επηρεάζουν την παραγωγή ισταμίνης στη σάρκα των ψαριών. Οι Skovgard και Elleman (1978) αναφέρουν ότι επιδημικές εξάρσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη είναι συχνότερες στο τέλος του καλοκαιριού, οπότε η θερμοκρασία των νερών είναι η μεγαλύτερη του έτους και τα ψάρια (ιδίως τα σκουμπριά) έχουν την μεγαλύτερη λιποπεριεκτικότητα.

Πολλά είδη ψαριών που αλιεύονται σε θάλασσες με θερμά ύδατα έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση δηλητηρίασης. Η θερμοκρασία τους κατά τη στιγμή της αλίευσης είναι δυνατόν να υπερβαίνει τους 20°C (Lehane και Olley, 2000).

Επιμολύνσεις μετά την αλίευση

Τα βακτήρια που παράγουν ισταμίνη απομονώνονται από το δέρμα, τα βράγχια, το έντερο και από το μυϊκό ιστό των ψαριών. Τα συγκεκριμένα βακτήρια προέρχονται είτε από το υδάτινο περιβάλλον, είτε από επιμολύνσεις κατά τους χειρισμούς των ψαριών μετά την αλίευση (Lehane και Olley, 2000).

Οι Yoshinaga και Frank (1982) αναφέρουν ότι τα βακτήρια που αποκαρβοξυλιώνουν την ισταμίνη αποτελούν το 1% της επιφανειακής μικροβιακής χλωρίδας των νωπών ψαριών και υπέθεσαν ότι η παρατεταμένη αποθήκευση, σε συνδυασμό με αυξημένη θερμοκρασία συντήρησης επιτρέπει την είσοδο των βακτηρίων στη μυϊκή μάζα των ψαριών, όπου μετατρέπουν την ιστιδίνη σε ισταμίνη.

Οι περισσότεροι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι οι βακτηριακές επιμολύνσεις μετά την αλίευση αποτελούν την κυριότερη πηγή ισταμινοπαραγωγών στελεχών (Scoging, 1998· Lehane και Olley, 2000· Takahashi και συν., 2003).

Οι Taylor και Speckhard (1983) εξέτασαν τη μικροβιακή χλωρίδα των βραγχίων, του εντέρου και της σάρκας κατεψυγμένης παλαμίδας και απομόνωσαν ισταμινοπαραγωγά βακτήρια των ειδών *M. morgani* και *C. freundii* μόνο από τα βράγχια τριών από τα δέκα ψάρια που έλεγξαν. Λόγω αυτού του ευρήματος οι συγγραφείς συμπέραναν ότι τα



Εντεροβακτηριακά δεν περιλαμβάνονται στη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών και ότι η παρουσία τους σε αυτά είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης. Συγκεκριμένα τα βράγχια είναι το σημείο από το οποίο συνήθως συγκρατείται το ψάρι κατά την μεταφορά του. Αργότερα οι Taylor και συν. (1989) επέκτειναν αυτή την άποψη προτείνοντας ότι τα περισσότερα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια που ανευρίσκονται στα ψάρια είναι κοινά εντερικά βακτήρια ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης, άποψη με την οποία συμφωνεί και η Scoging (1998).

Στις ΗΠΑ οι περισσότερες επιδημικές εξάρσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη προκλήθηκαν από την κατανάλωση ψαριών που είχαν υποστεί λαθεμένους χειρισμούς κατά την αλιεία και την παραπέρα κατεργασία τους (Lehane και Olley, 2000). Η επιμόλυνση των ψαριών μετά την αλίευση είναι δυνατόν να συμβεί στο αλιευτικό σκάφος, στη μονάδα επεξεργασίας της ξηράς, κατά τη διανομή και κατά την επεξεργασία προς βρώση από τον καταναλωτή (Lehane και Olley, 2000). Επίσης εξαιρετικά σημαντικές είναι οι επιμολύνσεις στα εστιατόρια, ιδιαίτερα όταν ο τόννος είναι νωπός (Taylor και Eittenmiller, 1986).

Προσπαθώντας να κατανοήσουν την πηγή μόλυνσης των ψαριών οι Subburaj και συν. (1984) εξέτασαν τα καλάθια μεταφοράς, το πάτωμα του ιχθυοπωλείου και το νερό ψύξης των ψαριών των ιχθυοπωλείων στην πόλη Mangalore της Ινδίας. Εκτός αυτών, καταμέτρησαν την ολική μικροβιακή χλωρίδα, τον αριθμό των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων και τη συγκέντρωση ισταμίνης στα ψάρια αυτών των ιχθυοπωλείων. Τα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια που απομονώθηκαν ήταν στελέχη *M. morgani* (52%), *Pseudomonas* spp. (21%), *Plesiomonas* spp. (12%), *Providencia* spp. (8%), *Flavobacteria* (6%) και *Aeromonas* spp. (1%). Οι συγγραφείς δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ καταμέτρησης ισταμινοπαραγωγών στελεχών και συγκέντρωσης ισταμίνης, παρατήρηση που επιβεβαιώνει την άποψη ότι η σύνθεση της χλωρίδας είναι σημαντικότερη από τον αριθμό των ισταμινοπαραγωγών μικροβίων για την παραγωγή ισταμίνης στα ψάρια.

Στην περίπτωση που τα ψάρια δεν εκσπλαχνιστούν πριν τη συντήρησή τους, είναι δυνατόν να εξέλθουν από το έντερο βακτήρια και να αποικίσουν γειτονικές μυϊκές μάζες, ιδιαίτερα αν καθυστερήσει η ψύξη του ψαριού. Εάν μάλιστα αναπτυχθούν αναερόβια βακτήρια, όπως το *Cl. perfringens*, είναι δυνατόν να παραχθούν ένζυμα, τα οποία είναι ενεργά σε χαμηλές θερμοκρασίες (Olley και συν., 1985).

Θερμική κακομεταχείριση στα αλιευτικά σκάφη

Σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή από την αλίευση έως την τελική θερμική επεξεργασία των ψαριών, η αυξημένη θερμοκρασία είναι δυνατόν να προκαλέσει την παραγωγή



ισταμίνης. Η έκθεση των ψαριών σε αυξημένες θερμοκρασίες, ακόμα και για μικρά χρονικά διαστήματα, είναι δυνατόν να οδηγήσει στην παραγωγή ισταμίνης (Andersen, 1997). Ειδικά στην περίπτωση που η αλίευση γίνεται με δίχτυα τα ψάρια παραμένουν μεταθανάτια σε αυξημένη θερμοκρασία για αρκετές ώρες. Σημείο – κλειδί αποτελεί η ταχεία ψύξη των ψαριών σε θερμοκρασία 0 – 2°C αμέσως μετά την αλίευσή τους (Lehane & Olley, 2000).

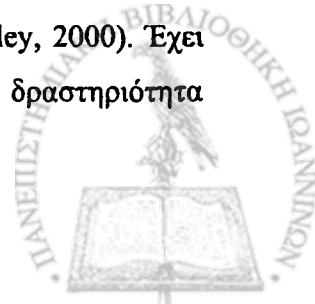
Οι τόννοι έχουν μεγαλύτερη θερμοκρασία σώματος από τα περισσότερα ψάρια. Κατά τη σύλληψη η θερμοκρασία του σώματός τους είναι δυνατόν να υπερβαίνει τους 32°C, θερμοκρασία στην οποία η ισταμίνη παράγεται με τριακονταπλάσια ταχύτητα από ότι σε θερμοκρασία ψύξης. Λόγω αυτού του γεγονότος, στον τόννο είναι απαραίτητο η ψύξη να γίνεται στο αλιευτικό σκάφος (Bartram, 1997a; Bartram, 1997b).

Η συντήρηση των ψαριών επάνω στο αλιευτικό σκάφος είναι ιδιαίτερα σημαντική. Συνήθως τα ψάρια τοποθετούνται σε κιβώτια με πάγο και η τοποθέτησή τους σε ψυγεία γίνεται αφού συμπληρωθεί το κιβώτιο με ψάρια. Η ταχύτητα ψύξης εξαρτάται από την ποσότητα που ψύχεται και από το μέγεθος των ψαριών. Η ταχεία ψύξη σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 4°C στο αλιευτικό σκάφος, αυξάνει το χρόνο συντήρησης των ψαριών (Taylor και Eittenmiller, 1986; Price, 2004). Ο ποιοτικός έλεγχος των εργασιών στα αλιευτικά σκάφη είναι το πρώτο στάδιο ελέγχου στο πλαίσιο εφαρμογής ενός σχεδίου υγειονομικού και ποιοτικού ελέγχου των ψαριών.

Αυξημένη θερμοκρασία συντήρησης σε ψύξη

Σχετικά με τη ιδανική θερμοκρασία συντήρησης των ψαριών υπό ψύξη υπάρχει διχογνωμία μεταξύ των ερευνητών. Ενώ η πλειοψηφία συμφωνεί ότι σε θερμοκρασία μικρότερη των 0°C η ποσότητα ισταμίνης που παράγεται είναι αμελητέα, δεν υπάρχει κοινά αποδεκτό κατώτερο όριο ασφάλειας θερμοκρασίας συντήρησης, καθώς και ιδανική θερμοκρασία παραγωγής ισταμίνης. Αυτό είναι αναμενόμενο λόγω της ποικιλομορφίας της μικροβιακής χλωρίδας των ψαριών (Lehane και Olley, 2000).

Η συντήρηση των ψαριών σε χαμηλές θερμοκρασίες επιβραδύνει την ανάπτυξη των περισσότερων ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων. Παρόλα αυτά ισταμινοπαραγωγά βακτήρια, που αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι δυνατόν να παράγουν μικρές ποσότητες ισταμίνης σε ψάρια που συντηρούνται σε θερμοκρασίες μεταξύ 0 και 10°C (Klaussen και Huss, 1987; Stratton και Taylor, 1991). Όταν όμως τα ψάρια παραμένουν σε αυξημένες θερμοκρασίες ψύξης (>10°C), έστω και για λίγες ώρες, οι βακτηριακοί πληθυσμοί πολλαπλασιάζονται, παράγοντας ικανές ποσότητες ένζυμων (Lehane και Olley, 2000). Έχει παρατηρηθεί ότι ακόμα και μετά την ψύξη των ψαριών, η ενζυμική δραστηριότητα



συνεχίζεται αυξάνοντας τις ποσότητες ισταμίνης σε αυτά (Klaussen και Huss, 1987· Stratton και Taylor, 1991).

Οι Ababouch και συν. (1991) εξέτασαν την επίδραση της ψύξης στην παραγωγή ισταμίνης σε πείραμα που περιλάμβανε εννιά ομάδες σαρδέλων από ιχθυοπωλεία του Μαρόκου. Οι νωπές και αλίπαστες σαρδέλες με αλάτι 5 – 8%, που συντηρήθηκαν στους 8°C, είχαν 12 h και 35 h αντίστοιχα μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από τις νωπές σαρδέλες που συντηρήθηκαν στους 17°C.

Στις ΗΠΑ έχει επισημανθεί ως σημαντικό πρόβλημα η μεταφορά νωπών ψαριών με φορτηγά – ψυγεία, στα οποία δεν είναι επαρκής ο έλεγχος της θερμοκρασίας ψύξης (Lehane και Olley, 2000).

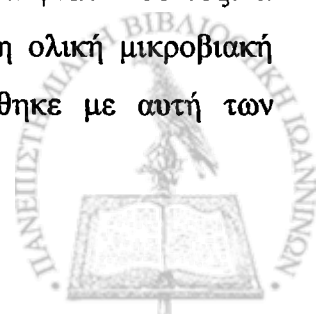
Συντήρηση σε κατάψυξη

Η συντήρηση των ψαριών σε θερμοκρασία κατάψυξης δεν αναστέλλει πάντα την παραγωγή ισταμίνης. Οι Ben Gigirey και συν. (1999) εξέτασαν τις μεταβολές των συγκεντρώσεων βιογενών αμινών και των βακτηριακών πληθυσμών σε σάρκα τόννου που συντηρήθηκε σε κατάψυξη στους – 18°C και – 25°C. Οι αρχικές συγκεντρώσεις των βιογενών αμινών ήταν μικρότερες των 0,8 mg/100 g. Όμως η συγκέντρωση της ισταμίνης, ενώ μειώθηκε στους τρεις μήνες κατάψυξης στους – 18°C, αυξήθηκε στο 102% της αρχικής συγκέντρωσης μετά από εννέα μήνες κατάψυξης. Η συγκέντρωση ισταμίνης στα ψάρια που συντηρήθηκαν στους – 25°C δεν αυξήθηκε, ενώ η ολική μεσόφιλη χλωρίδα επιβίωσε της κατάψυξης για εννέα μήνες και το ποσοστό επιβίωσης των ψυχρόφιλων βακτηρίων ήταν 4,6%.

Συντήρηση με αποξήρανση, αλάτιση και κάπνιση

Τοξικές συγκεντρώσεις ισταμίνης έχουν βρεθεί σε αποξηραμένα και καπνιστά ψάρια (Taylor, 1983). Η έκθεση των ψαριών σε αυξημένες θερμοκρασίες αυξάνει αρχικά την παραγωγή ισταμίνης, ενώ η αποξήρανση που ακολουθεί έχει ως αποτέλεσμα μείωση της παραγωγής της (Lehane και Olley, 2000).

Οι Trinidad και συν. (1986) εξέτασαν φιλέτα σκουμπριού που καπνίστηκαν για 8 h στους 45°C και συντηρήθηκαν στους 0 – 5°C, με κενό αέρος και χωρίς. Η συγκέντρωση ισταμίνης αυξήθηκε και στους δύο τύπους συσκευασίας, χωρίς όμως να φτάσει σε τοξικά επίπεδα. Τα φιλέτα που συντηρήθηκαν σε κενό αέρος είχαν μικρότερη ολική μικροβιακή χλωρίδα στο μέσο του χρόνου συντήρησης, η οποία όμως εξισώθηκε με αυτή των συσκευασμένων χωρίς κενό, στο τέλος του χρόνου συντήρησης.



Η θερμή κάπνιση θανατώνει τα περισσότερα βακτήρια και απενεργοποιεί τα περισσότερα ένζυμα, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο το χρόνο συντήρησης των ψαριών. Δεν καταστρέφει όμως την προσχηματισμένη ισταμίνη (Lehane και Olley, 2000). Οι Fletcher και συν. (1998) εξέτασαν τη συγκέντρωση ισταμίνης και την ολική μικροβιακή χλωρίδα σε 107 δείγματα καπνιστών ψαριών από ιχθυοπωλεία της Νέας Ζηλανδίας. Σε οκτώ δείγματα η συγκέντρωση ισταμίνης ήταν >50 mg/kg, ενώ σε δύο δείγματα η συγκέντρωση υπερέβαινε τα 200 mg/kg (346 και 682 mg/kg). Η ολική μικροβιακή χλωρίδα δεν ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης ισταμίνης. Συγκεκριμένα στο δείγμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ισταμίνης η ολική μικροβιακή χλωρίδα ήταν μικρότερη από 6,3 CFU/g. Η πιθανή εξήγηση του φαινομένου είναι ότι τα διάφορα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια θανατώθηκαν κατά την κάπνιση, ενώ η προσχηματισμένη ισταμίνη δεν αλλοιώθηκε λόγω της θερμοανθεκτικότητάς της.

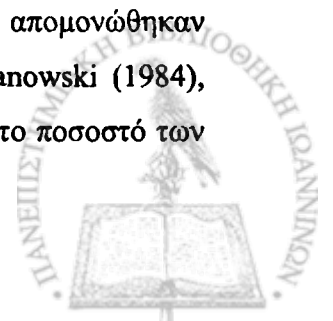
Ο Van Sproekens (1987) αναφέρει τοξικές συγκεντρώσεις ισταμίνης σε ελαφρά αλατισμένη ρέγγα, που συσκευάστηκε σε κενό αέρος και συντηρήθηκε σε θερμοκρασία ψυγείου. Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης ήταν ιδιαίτερα αυξημένες μετά τον ενοφθαλμισμό των ρεγγών με ισταμινοπαραγωγά στελέχη *Photobacterium spp* πριν από την κατεργασία τους.

Κονσερβοποίηση

Κατά το παρελθόν αρκετά περιστατικά δηλητηρίασης από ισταμίνη αποδόθηκαν στην κατανάλωση κονσερβοποιημένου ψαριού (Taylor, 1983). Η παρουσία ισταμίνης σε κονσέρβες ψαριών οφείλεται κατά κύριο λόγο στη θερμική κακομεταχείριση πριν την κονσερβοποίηση. Η βελτίωση των συνθηκών κονσερβοποίησης λόγω της εφαρμογής κανόνων HACCP μειώνει τον κίνδυνο πρόκλησης δηλητηρίασης από ισταμίνη. Ο έλεγχος σε όλα τα στάδια της παραγωγής ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο και μειώνει το μεγάλο οικονομικό κόστος του ελέγχου του τελικού προϊόντος (Lehane και Olley, 2000).

A.1.4.1.2. Ισταμινοπαραγωγά βακτήρια στα ψάρια

Παρότι μόνο το 1% της μικροβιακής χλωρίδας των ζώντων ψαριών ανήκει στα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια (Kimata, 1961), το ποσοστό αυτό αυξάνεται καθώς προχωρεί η αλλοίωση του ψαριού. Οι Omura και συν. (1978) αναφέρουν ότι το 31% των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών από παλαμίδα και σαφριδί θερμών νερών ήταν παραγωγείς ισταμίνης. Οι Yoshinaga και Frank (1982) αναφέρουν ότι το 13,4% των στελεχών που απομονώθηκαν από αλλοιωμένη παλαμίδα ήταν παραγωγείς ισταμίνης. Οι Frank και Baranowski (1984), μετά από εξέταση αλλοιωμένων κορυφαίνων (mahi – mahi), αναφέρουν ότι το ποσοστό των



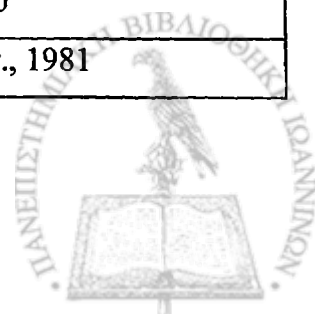
ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων ήταν το 7% των στελεχών που απομονώθηκαν από ψάρια που συντηρούνταν σε θερμοκρασία δωματίου και το 9% των στελεχών που απομονώθηκαν από ψάρια που συντηρούνταν υπό ψύξη.

Οι Taylor και συν. (1978b) απομόνωσαν 112 είδη βακτηρίων τα οποία παρήγαγαν το ένζυμο αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης. Τα περισσότερα ανήκαν στις οικογένειες των Εντεροβακτηριακών, των Λακτοβάκιλλων και των *Clostridium* spp.. Από τα εντερικής προέλευσης βακτήρια η *Morganella morganii*, *Klebsiella* spp. και *Hafnia alvei* αποτελούν τους κατεξοχήν παραγωγείς ισταμίνης σε ψάρια που συντηρούνται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 4°C (Stratton και Taylor, 1991) και είναι τα βακτήρια που συχνότερα εμπλέκονται στην πρόκληση δηλητηρίασης από ισταμίνη (Taylor, 1983). Τα είδη *Lactobacillus* spp., που είναι επίσης ικανότατοι παραγωγείς ισταμίνης, θεωρείται ότι συμβάλλουν στην παραγωγή ισταμίνης μόνο σε ορισμένα προϊόντα ψαριών τα οποία υφίστανται ζύμωση (Taylor και Eitenmiller, 1986).

Οι Niven και συν. (1981) αναφέρουν και τα δονάκια ως ισταμινοπαραγωγά βακτήρια. Συγκεκριμένα απομόνωσαν στελέχη *Vibrio alginolyticus* που παρήγαγαν ισταμίνη σε αλλοιωμένη παλαμίδα και αλλοιωμένη κορυφαίνα. Επίσης τα *Vibrio harvei*, *Vibrio fisheri* και *Photobacterium leiognathi* είναι ικανά να παράγουν ισταμίνη σε αυξημένες θερμοκρασίες (Ramesh και Venugopalan, 1986), ενώ άλλα είδη *Photobacterium* spp. και *Vibrio* spp. πιθανόν να ευθύνονται για την παραγωγή ισταμίνης σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Morii και συν., 1986). Τα είδη των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από ψάρια αναφέρονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Ισταμινοπαραγωγά βακτήρια που απομονώθηκαν από ψάρια θαλάσσης

Είδος βακτηρίων	Είδος ψαριών	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>Citrobacter freundii</i>	Παλαμίδα	Taylor και Speckhard, 1983
<i>Clostridium perfringens</i>	Παλαμίδα	Yoshinaga και Frank, 1982
<i>Edwardsiella</i> spp.	Κορυφαίνα	Niven και συν., 1981
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Παλαμίδα	Ferencik, 1970
	Τόννος, κορυφαίνα	Niven και συν., 1981
<i>Enterobacter cloacae</i>	Τόννος	Niven και συν., 1981
<i>Escherichia coli</i>	Τοξικός τόννος	Ferencik, 1970
	Τόννος	Niven και συν., 1981



Πίνακας 9. (συνέχεια)

Είδος βακτηρίων	Είδος ψαριών	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>Hafnia alvei</i>	Τόννος	Havelka, 1967
	Τοξικός τόννος	Ferencik, 1970
	Παλαμίδα, Κοκκάλι	Omura και συν., 1978
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Τοξικός τόννος	Lerke και συν., 1978
	Τόννος, κορυφαίνα	Niven και συν., 1981
	Τοξικός τόννος	Taylor και συν., 1979
	Παλαμίδα	Yoshinaga και Frank, 1982
<i>Klebsiella spp.</i>	Παλαμίδα, Κοκκάλι	Omura και συν., 1978
<i>Proteus mirabilis</i>	Τοξικός τόννος μεγαλομάτης	Kawabata και συν., 1955
	Παλαμίδα	Yoshinaga και Frank, 1982
<i>Morganella morganii</i>	Τοξικός τόννος μεγαλομάτης	Kawabata και συν., 1955
	Ψάρι	Kimata, 1961
	Παλαμίδα, Κοκκάλι	Omura και συν., 1978
	Τόννος, κορυφαίνα, Σκουμπρί	Niven και συν., 1981
	Παλαμίδα	Taylor και Speckhard, 1983
<i>Proteus spp.</i>	Τοξικός τόννος	Ferencik, 1970
	Παλαμίδα, Κοκκάλι	Omura και συν., 1978
	Σκουμπρί	Niven και συν., 1981
<i>Proteus vulgaris</i>	Τοξικός τόννος μεγαλομάτης	Kawabata και συν., 1955
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Παλαμίδα	Yoshinaga και Frank, 1982
<i>Vibrio spp.</i>	Σκουμπρί	Niven και συν., 1981

Διαφορές στην παραγωγή ισταμίνης μεταξύ βακτηρίων του ίδιου είδους

Τα διάφορα είδη βακτηρίων διαφέρουν αρκετά ως προς την ποσότητα των αποκαρβοξυλασών της ιστιδίνης που παράγουν και την ενεργότητα αυτών των ένζυμων. Η *Morganella morganii* απαιτεί συγκεντρώσεις ιστιδίνης 100 – 200 mg/100 g για να παράγει



αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης. Η *Hafnia alvei* αποκαρβοξυλιώνει ιστιδίνη όταν αυτή βρίσκεται σε συγκεντρώσεις <50 mg/100 g (Ferencik, 1970).

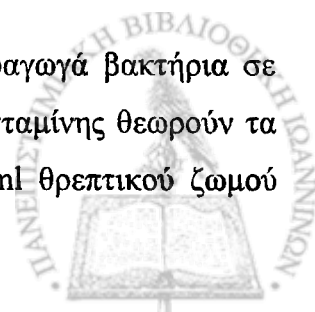
Οι Eitenmiller και συν. (1981, 1982), όταν μελέτησαν τους παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αποκαρβοξυλασών της ιστιδίνης σε 22 στελέχη *Morganella morganii*, βρήκαν ότι όλα τα στελέχη είχαν δυνατότητα παραγωγής ισταμίνης, σε ποικίλες όμως συγκεντρώσεις. Οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας ενός στελέχους με ιδιαίτερα έντονη παραγωγή αποκαρβοξυλάσης, ήταν 37°C και pH=6,5. Η ελάχιστη ενζυμική δραστηριότητα παρατηρήθηκε όταν το ίδιο στέλεχος καλλιεργήθηκε σε pH=8,5. Επίσης σε φιλέτα τόννου που ενοφθαλμίστηκαν με καλλιέργεια *M. morganii* διαπιστώθηκε γρήγορη αύξηση της συγκέντρωσης αποκαρβοξυλάσης και ισταμίνης όταν το φιλέτο συντηρήθηκε στους 24 °C και 30°C, σε αντίθεση με τη συντήρησή του στους 15 °C.

Οι Olley και Baranowski (1985) επίσης αναφέρουν ότι η σύντομη έκθεση των βακτηρίων σε αυξημένες θερμοκρασίες είναι δυνατόν να οδηγήσει στην παραγωγή αποκαρβοξυλασών. Κατά τη συντήρηση των ψαριών τα βακτήρια δεν παράγουν αποκαρβοξυλάσες, όμως υπάρχει πιθανότητα οι ήδη σχηματισμένες αποκαρβοξυλάσες να συνεχίζουν να παράγουν ιστιδίνη με πολύ αργό ρυθμό. Οι Klaussen και Huss (1987) όταν μελέτησαν την παραγωγή ισταμίνης από *Morganella morganii* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ιστιδίνη, βρήκαν ότι το βακτήριο παρήγαγε μεγάλες ποσότητες ισταμίνης σε χαμηλή θερμοκρασία (0 – 5°C), όταν προηγουμένως είχε καλλιεργηθεί στους 10 – 25°C.

Οι Fujii και συν. (1994) αναφέρουν ότι η ενεργότητα των αποκαρβοξυλασών των *Photobacterium phosphoreum* και *P. histaminum* μειώθηκε στο 27% και 53% μετά από συντήρηση βακτηριακών κυττάρων για επτά ημέρες στους 4°C και – 20°C αντίστοιχα, ενώ ο αριθμός των ζώντων βακτηριακών κυττάρων μειώθηκε. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι είναι δυνατόν να παραχθεί ισταμίνη ακόμα και από μικρούς αριθμούς βακτηρίων.

Στην περίπτωση που απομονώνονται πολλά στελέχη του ίδιου βακτηρίου από τοξικά ψάρια, συνήθως μόνο ένα ή λίγα από τα στελέχη είναι αυτά που παράγουν την μεγαλύτερη ποσότητα ισταμίνης (Taylor και συν., 1979' Yoshinaga και Frank, 1982). Τα περισσότερα στελέχη της *M. morganii* παράγουν αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης ενώ μόνο μερικά στελέχη *K. pneumoniae* και *H. alvei* παράγουν το συγκεκριμένο ένζυμο. Οι Taylor και συν. (1979) μεταξύ 25 στελεχών *K. pneumoniae* που απομόνωσαν, βρήκαν 12 ισταμινοπαραγωγά, από τα οποία μόνον ένα στέλεχος παρήγαγε μεγάλες ποσότητες ισταμίνης.

Οι Behling και Taylor (1982) κατηγοριοποίησαν τα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια σε ταχείς και σε βραδείς παραγωγούς ισταμίνης. Ως ταχείς παραγωγούς ισταμίνης θεωρούν τα βακτήρια που παράγουν ισταμίνη σε συγκεντρώσεις >100 mg/ 100 ml θρεπτικού ζωμού



εκχυλίσματος τόννου (Tuna Fish Infusion Broth, TFIB) μετά από επώαση σε θερμοκρασία $>15^{\circ}\text{C}$ για 24 h, ενώ ως βραδείς παραγωγούς ισταμίνης θεωρούν τα βακτήρια που παράγουν ισταμίνη σε συγκεντρώσεις $<25\text{ mg/ }100\text{ ml}$ σε TFIB μετά από επώαση σε θερμοκρασία $>30^{\circ}\text{C}$ για χρόνους μεγαλύτερους των 48 h. Ως ταχείς παραγωγείς ισταμίνης αναφέρουν την *M. morgani*, την *K. pneumoniae* και το *E. aerogenes*, ενώ ως βραδείς παραγωγούς τη *H. alvei*, το *C. freundii* και την *E. coli*.

Η Leung το 1987 (Lehane και Olley, 2000) απομόνωσε 36 βακτηριακά στελέχη από επιφανειακές εκπλύσεις σκουμπριού. Όλα τα απομονωθέντα στελέχη *M. morgani* ήταν ταχείς παραγωγείς ισταμίνης. Το βακτήριο που παρήγαγε τη μεγαλύτερη ποσότητα ισταμίνης ήταν ένα από τα δύο απομονωθέντα στελέχη *Acinetobacter calcoaceticus* (το δεύτερο στέλεχος δεν παρήγαγε καθόλου ισταμίνη). Από τα υπόλοιπα απομονωθέντα στελέχη η μία από τις τρεις *K. pneumoniae* και η μία από τις τέσσερις *A. hydrophila* παρήγαγαν ισταμίνη.

Ορισμένοι ερευνητές θεωρούν ότι τα υπόλοιπα βακτήρια που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως παραγωγείς ισταμίνης, ανήκουν στην κατηγορία των βραδέων παραγωγών ισταμίνης και σημειώνουν ότι πιθανώς και άλλα βακτήρια πρέπει να περιληφθούν στην κατηγορία των ταχέων παραγωγών ισταμίνης (Taylor και συν., 1978b· Yoshinaga και Frank, 1982· Taylor, 1985).

A.1.4.2. Τυριά

Τα τυριά, ως αίτια πρόκλησης δηλητηρίασης από ισταμίνη, έχουν ενοχοποιηθεί σχετικά πρόσφατα. Η πρώτη περίπτωση δηλητηρίασης από ισταμίνη, όπου το υπεύθυνο τρόφιμο ήταν τυρί, παρουσιάστηκε στην Ολλανδία και αφορούσε άτομο που κατανάλωσε υπερώριμο τυρί Gouda (Doeglas και συν., 1967). Λόγω του γεγονότος ότι το συγκεκριμένο τυρί ήταν ακατάλληλο προς βρώση σύμφωνα με τους υγειονομικούς κανόνες, δεν δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στο συγκεκριμένο περιστατικό. Το 1976 όμως αναφέρεται σημαντική επιδημική έξαρση δηλητηρίασης από ισταμίνη στις Η.Π.Α. λόγω κατανάλωσης ελβετικού τυριού, κατά την οποία νόσησαν 38 άτομα (Straton και συν., 1991). Μια δεύτερη επιδημική έξαρση εξελίχτηκε στο υποβρύχιο των Η.Π.Α. «Benjamin Franklin», κατά την οποία έξι άτομα νόσησαν λόγω της κατανάλωσης ελβετικού τυριού (Taylor και συν., 1982). Μία περίπτωση δηλητηρίασης από ισταμίνη αναφέρεται στη Γαλλία από κατανάλωση τυριού Gruyere (Taylor και Eitenmiller, 1986), ενώ αναφέρονται δύο περιστατικά δηλητηρίασης από ισταμίνη σε ασθενείς υπό θεραπεία με ισονιαζίδη (Kahana και Todd, 1981· Taylor και Eitenmiller, 1986) που κατανάλωσαν τυρί Cheddar και Chessire αντίστοιχα.



A.1.4.3. Οινοπνευματώδη ποτά

Στα κρασιά οι κυριότερες βιογενείς αμίνες είναι η πουτρεσκίνη, η ισταμίνη και η τυραμίνη (Romero και συν., 2002). Πολλές φορές η κατανάλωση αλκοολούχων ποτών ζύμωσης έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση κεφαλαλγίας και ερυθήματος στο πρόσωπο που αποδίδονται στην ύπαρξη βιογενών αμινών (Stratton και συν., 1991). Σχεδόν αποκλειστικά ενοχοποιούνται τα κόκκινα κρασιά, γιατί έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βιογενών αμινών από τα λευκά, πιθανώς λόγω του αυξημένου pH που ευνοεί την παραγωγή βιογενών αμινών σε αυτά (Stratton και συν., 1991· Romero και συν., 2002). Οι βιογενείς αμίνες παράγονται κυρίως κατά τη διάρκεια της μηλικογαλακτικής ζύμωσης (malolactic) του κρασιού που έπεται της αλκοολικής ζύμωσης (Lonvaud – Funel, 2001). Η παραγωγή των βιογενών αμινών στα κρασιά έχει συνδεθεί με την έλλειψη ορθών πρακτικών υγιεινής κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (Moreno-Arribas και συν., 2003). Συγκεκριμένα η παραγωγή ισταμίνης στα κρασιά αποδίδεται σε βακτήρια επιμόλυνσης και κυρίως σε *Pediococcus* spp. Εκτός αυτών κατά καιρούς έχουν ενοχοποιηθεί και άλλα βακτήρια, όπως ο *Oenococcus oeni* και ο *Lactobacillus brevis* (Lonvaud – Funel, 2001).

Κατά καιρούς η κατανάλωση μπίρας έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση δηλητηρίασης από βιογενείς αμίνες (Kalač και συν., 2002). Τα συμπτώματα παρατηρήθηκαν μετά την κατανάλωση τόσο αλκοολούχου όσο και μη αλκοολούχου μπίρας και αποδίδονται στην τυραμίνη που περιείχε το ποτό. Οι Kalač και συν. (2002) σε ανασκόπηση 16 εργασιών αναφέρουν ότι οι κύριες βιογενείς αμίνες που ανευρίσκονται στις μπίρες είναι η αγματίνη (~10 mg/L), η τυραμίνη (~5 mg/L), η πουτρεσκίνη (~5 mg/L), η καδαβερίνη (~5 mg/L), η τρυπταμίνη (~2 mg/L) και η ισταμίνη (~1 mg/L).

A.1.4.4. Άλλα τρόφιμα

Υψηλά επίπεδα ισταμίνης και άλλων βιογενών αμινών έχουν αναφερθεί σε αρκετά τρόφιμα, στην παρασκευή των οποίων υπάρχει κάποιο στάδιο ζύμωσης ή συντήρησης για μεγάλο χρονικό διάστημα (Taylor και Eitenmiller, 1986). Στη Γερμανία αναφέρεται περιστατικό δηλητηρίασης από ισταμίνη μετά από κατανάλωση ξινολάχανου (Mayer και Pause, 1972). Ένα άλλο περιστατικό αναφέρεται στη Γαλλία μετά από κατανάλωση χοιρομεριού ωρίμανσης (Taylor, 1985). Σε αυτά όμως τα περιστατικά η σύνδεση του τροφίμου με την πρόκληση της νόσου δεν είναι σαφής (Taylor και Eitenmiller, 1986).



Άλλα τρόφιμα που περιέχουν αυξημένες συγκεντρώσεις ισταμίνης είναι δυνατόν θεωρητικά να προκαλέσουν την εκδήλωση του συνδρόμου. Υψηλοπρωτεϊνικές τροφές που υφίστανται ζύμωση, όπως τα κρεατοσκευάσματα ωρίμανσης (αλλαντικά), έχουν μεγάλες συγκεντρώσεις ισταμίνης (Taylor και Eitenmiller, 1986· Silla – Santos, 1996).

A.1.5. Κλινική εικόνα

Τα συμπτώματα της δηλητηρίασης από ισταμίνη εκδηλώνονται σε μερικά λεπτά έως μερικές ώρες μετά την κατανάλωση τοξικού ψαριού και διαρκούν συνήθως μερικές ώρες (Taylor και Eittenmiler, 1986). Σε σπάνιες περιπτώσεις τα συμπτώματα μπορεί να διαρκέσουν και αρκετές ημέρες (Lerke και συν., 1978· Todd και συν., 1981). Τα κύρια συμπτώματα που παρατηρούνται είναι δερματικά (ερύθημα, εφίδρωση, κνίδωση, τοπικά οιδήματα και φλεγμονές), γαστρεντερικά (ναυτία, έμετος, διάρροια, κοιλιακό άλγος), καρδιαγγειακά (υπόταση λόγω περιφερικής αγγειοδιαστολής, καρδιακές αρρυθμίες) και νευρικά (κεφαλαλγίες, μούδιασμα, αίσθημα καύσου και κνησμός) (Taylor, 1985· Taylor και Eittenmiler, 1986· Lehane και Olley, 2000). Σε σοβαρότερες περιπτώσεις είναι δυνατόν να παρατηρηθεί βρογχόσπασμος και δύσπνοια (Shalaby, 1996).

Το πιο συχνό κλινικό εύρημα σύμφωνα με τους Arnold και Brown (1978) και τον Kim (1979) είναι το ερύθημα σε λαιμό και πρόσωπο, που προκαλεί αίσθηση υπερθερμίας και δυσφορίας στον ασθενή. Τα ερυθρήματα παρουσιάζονται κυρίως στις εκτεθειμένες περιοχές του δέρματος και μοιάζουν αρκετά με τις αλλοιώσεις του ηλιακού εγκαύματος (Kim, 1979).

Οι Arnold και Brown (1978) αναφέρουν ότι τα γαστρεντερικά συμπτώματα απαντώνται μόνο στο 25% των περιστατικών, σε αντίθεση με τους Gilbert και συν. (1980), οι οποίοι αναφέρουν ότι σε 30 επιδημικές εξάρσεις με 150 περιστατικά, γαστρεντερικά συμπτώματα εμφανίστηκαν στις 24 από τις 30 επιδημικές εξάρσεις. Διάρροια επίσης παρατήρησαν και οι Müller και συν. (1992) στο 77% των ασθενών σε 20 περιστατικά δηλητηρίασης από ισταμίνη στη Νότια Αφρική. Η διάρροια ήταν το δεύτερο σε συχνότητα σύμπτωμα μετά από την εμφάνιση ερυθρημάτων σε πρόσωπο και λαιμό, που παρουσιάστηκε στο 82% των ασθενών.

Εκτός αυτών των συμπτωμάτων είναι δυνατόν να εμφανιστούν και αγγωτικές εκδηλώσεις (Sabroe και Kobza Black, 1998· Specht, 1998). Επίσης έχει αναφερθεί περίπτωση κατά την οποία εμφανίστηκε παροδική απώλεια όρασης συνοδευόμενη από κολπική ταχυκαρδία. Τα άλλα συμπτώματα που εμφανίστηκαν στο συγκεκριμένο ασθενή ήταν τα τυπικά τη δηλητηρίασης από ισταμίνη. Η χορήγηση αντισταμινικής αγωγής είχε ως



αποτέλεσμα τη γρήγορη ανάρρωση και την επιστροφή της όρασης (McInerney και συν., 1996· Clark, 1997).

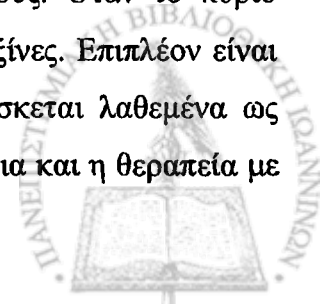
Οι Wu και συν. (1997) περιέγραψαν δύο περιστατικά δηλητηρίασης από ισταμίνη στη Ταϊβάν το 1996. Το πρώτο περιστατικό προκλήθηκε από την κατανάλωση μη σκομβροειδούς ψαριού. Ο ασθενής παρουσίασε ερυθρήματα στο πρόσωπο, ζάλη, κεφαλαλγία, υπεραιμία του κερατοειδούς και υπόταση. Ο δεύτερος ασθενής που νόσησε από την κατανάλωση σκομβροειδούς ψαριού, παρουσίασε ζάλη, διάρροια, ερύθημα προσώπου και κεφαλαλγία. Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης και καδαβερίνης στο υπεύθυνο τρόφιμο ήταν 84 και 8,5 mg / 100 g αντίστοιχα στο πρώτο περιστατικό και 272 και 23 mg / 100 g αντίστοιχα στο δεύτερο περιστατικό.

Σπάνια παρατηρούνται σοβαρότερες επιπλοκές, οι οποίες όμως αφορούν κυρίως ασθενείς με προϋπάρχουσα νόσο του αναπνευστικού ή καρδιαγγειακού συστήματος (Bogysiewicz και Krikler, 1981· Senanayake και Vytavanathan, 1981· Taylor και συν., 1989). Η δηλητηρίαση από ισταμίνη είναι γενικά ήπια νόσος (Taylor και Eittenmiller, 1986). Σε σπάνιες περιπτώσεις έχει αποδειχθεί θανατηφόρος (Eitenmiller και συν., 1981). Οι Arnold και Brown (1978) αναφέρουν ότι η νοσηρότητα κυμαίνεται μεταξύ 0,07 και 100%, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Η τεράστια διακύμανση οφείλεται μάλλον στις διαφορετικές συγκεντρώσεις ισταμίνης που παρατηρούνται σε ψάρια διαφορετικών ή ακόμα και της ίδιας παρτίδας. Συνεπώς, η ποσότητα ισταμίνης που προσλαμβάνεται από κάθε άτομο διαφέρει σημαντικά. Σε επιδημικές εξάρσεις η αναλογία προσβολής είναι σχεδόν 100%, με την εξαίρεση επιδημικών εξάρσεων στις οποίες καταναλώθηκε ωμό ψάρι, όπου η αναλογία προσβολής ήταν χαμηλότερη (Taylor και Eittenmiller, 1986· Wu και συν., 1997).

A.1.6. Διάγνωση

Η διάγνωση της νόσου βασίζεται στα τυπικά κλινικά συμπτώματα του συνδρόμου, στη σύντομη περίοδο επώασης και στο ιστορικό κατανάλωσης είδους ψαριού, που είναι δυνατόν να προκαλέσει τη νόσο. Η διάγνωση επιβεβαιώνεται με την εξέταση της συγκέντρωσης ισταμίνης στο ύποπτο τρόφιμο, σε υπολείμματά του ή σε ψάρι από την ίδια παρτίδα.

Τα συμπτώματα της δηλητηρίασης από ισταμίνη δεν είναι ειδικά της νόσου και παρατηρούνται και σε άλλες τροφιμογενείς ή μη τροφιμογενείς νόσους. Όταν το κύριο σύμπτωμα είναι η διάρροια είναι δυνατόν να εμπλέκονται και άλλες τοξίνες. Επιπλέον είναι αρκετά συχνό το φαινόμενο η δηλητηρίαση από ισταμίνη να διαγνώσκεται λαθεμένα ως τροφική αλλεργία. Στην τροφική αλλεργία τα συμπτώματα είναι παρόμοια και η θεραπεία με



αντιισταμινικά είναι αποτελεσματική. Η διαφοροποίηση είναι δυνατόν να γίνει σχετικά εύκολα με βάση την έλλειψη ιστορικού αλλεργίας στο συγκεκριμένο είδος ψαριού, την προσβολή πέραν του ενός ατόμου και την ανίχνευση αυξημένων συγκεντρώσεων ισταμίνης στο τρόφιμο. Εκτός αυτών τα ψάρια τα οποία συνήθως προκαλούν τη δηλητηρίαση από ισταμίνη, σπάνια ενοχοποιούνται για την πρόκληση αλλεργιών. Για τον αποκλεισμό της τροφικής αλλεργίας είναι δυνατόν να γίνει η δοκιμασία ενδοδερμικής έγχυσης αλλεργιογόνων των συγκεκριμένων ψαριών (Taylor και Eittenmiller, 1986).

A.1.7. Θεραπεία

Χορηγείται αντιισταμινική θεραπεία. Τα φάρμακα επιλογής είναι H_1 αναστολείς, όπως η διφενυδραμίνη και η χλωροφενυραμίνη, αλλά είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και H_2 αναστολείς, όπως η σιμετιδίνη (Guss, 1998). Ο Downs (1997) προτείνει επίσης την πρόκληση εμέτου. Λόγω της βραχείας διάρκειας και της ήπιας φύσης της νόσου, η θεραπεία δεν είναι πάντα απαραίτητη (Taylor και Eittenmiller, 1986).

A.1.8. Μέθοδοι ανίχνευσης ισταμίνης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ισταμίνης στο ψάρι είναι απαραίτητος για την προστασία της Δημόσιας Υγείας. Πολλές μέθοδοι έχουν αναφερθεί κατά καιρούς στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης στα τρόφιμα. Οι πρώτες μέθοδοι ήταν βιολογικές. Ο Geiger (1944) πρώτος χρησιμοποίησε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης σε ψάρια μέθοδο, η οποία βασίζεται στη μέτρηση των συσπάσεων απομονωμένου λεπτού εντέρου ινδικού χοιριδίου.

Σταδιακά οι βιολογικές μέθοδοι αντικαταστάθηκαν από απλούστερες και πιο αξιόπιστες χημικές ή ανοσοενζυμικές μεθόδους. Η τρέχουσα βιβλιογραφία περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό μεθοδολογιών ανίχνευσης ισταμίνης, οι οποίες διακρίνονται σε βιολογικές, χημικές, ενζυμικές, χρωματογραφικές (χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και αέρια χρωματογραφία), ανοσοενζυμικές και καλλιεργητικές. Οι τελευταίες βασίζονται ουσιαστικά στην ανίχνευση ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων και είναι οι ευκολότερες, οικονομικότερες, δεν απαιτούν ειδικό εξοπλισμό, αλλά δεν είναι ιδιαίτερα αξιόπιστες μέχρι στιγμής. Οι πλέον αποδεκτές μέθοδοι ανίχνευσης της ισταμίνης σε ψάρια αναφέρονται στον Πίνακα 10.



Πίνακας 10. Μέθοδοι προσδιορισμού ισταμίνης

Τρόφιμο	Μέθοδος	Βιβλιογραφική αναφορά
Ψάρια	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis)	Mopper και Sciacchitano, 1993
Κονσερβοποιημένα ψάρια	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	Yen and Hsieh, 1991
Κονσερβοποιημένος τόννος	Φθορισμομετρική	Lerke and Bell, 1976
Προϊόντα ψαριών	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)	Schutz και συν., 1976
Ψάρια	Ενζυμική	Lerke και συν., 1983
Ψάρια	Φθορισμομετρική	Taylor και συν., 1978a
Ψάρια	Μέτρησης οξυγόνου (Oxygen-sensor-based method)	Ohashi και συν., 1994
Αλιεύματα	(Automated kinetics-enhanced flow-injection method)	Hungerford και συν., 2001
Αλιεύματα	Βιολογική	AOAC, 1995a
Αλιεύματα	Χημική	AOAC, 1995b
Αλιεύματα	Flow-injection method	Hungerford και συν., 1990
Αλιεύματα	Φθορισμομετρική	AOAC, 1995c
Τόννος	Χήλωσης (chelation) χαλκού	Bateman και συν., 1994
Νωπός & κονσερβοποιημένος τόννος	Ειλεού ινδικού χοιριδίου	Geiger, 1944

Πηγή: Lehane και Olley, 2000.

A.1.8.1. Ημιποσοτικές μέθοδοι

A.1.8.1.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

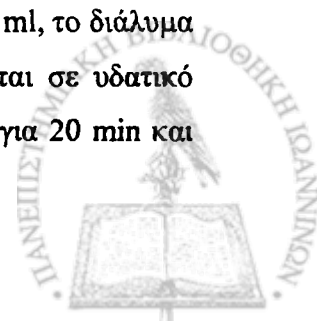
Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είναι ημιποσοτική μέθοδος. Χαρακτηρίζεται από ευαισθησία ανίχνευσης, από χαμηλό κόστος και από ευκολία χειρισμών.

Οι Lin και συν. (1977) περιέγραψαν μέθοδο όπου εκχυλίζονται 10 g ομογενοποιημένης σάρκας ψαριού με 50 ml μεθανόλης και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 100 ml. Ακολουθεί θέρμανση στους 60°C για 25 min, ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, αναγωγή σε 100 ml με μεθανόλη και φιλτράρισμα. Ποσότητα 10 έως 50 ml του εκχυλίσματος ενσταλλάσσεται σε γυάλινες πλάκες επαλειμμένες με πηκτή πυρίτιου (silica gel) μαζί με

πρότυπα διαλύματα ισταμίνης σε μεθανόλη (20 mg ισταμίνης σε 4 ml μεθανόλης). Οι πλάκες εμβαπτίζονται σε θάλαμο χρωματογραφίας σε φρέσκο διάλυμα υδροξειδίου του αμμωνίου σε μεθανόλη (1:20) για 40 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από ξήρανση της πλάκας στους 90°C για 8 min, η πλάκα ψεκάζεται με διάλυμα 3% νινυδρίνης σε μεθανόλη και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min πριν την ανάγνωσή της. Στην περίπτωση που το δείγμα ήταν υγρό, ενσταλλάσσεται απευθείας στην πλάκα, εξαλείφοντας έτσι το στάδιο της εκχύλισης με μεθανόλη. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται είτε με τη χρήση πυκνομέτρου, είτε προσεγγιστικά συγκρίνοντας την κηλίδα της ισταμίνης του δείγματος με αυτή των προτύπων διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 2 mg/100 g δείγματος.

Οι Schutz και συν. (1976) περιέγραψαν παρόμοια μέθοδο όπου αντί για εκχύλιση με μεθανόλη, χρησιμοποίησαν υδατικό διάλυμα σάρκας ή σφαιρικό τμήμα σάρκας χωρίς το δέρμα, βάρους 0,5 g. Το υδατικό διάλυμα κονσερβοποιημένων ψαριών σε άλμη παράγεται με την εφαρμογή μέτριας πίεσης στο κάλυμμα της κονσέρβας μετά το άνοιγμά της και την καθίζηση των έμορφων συστατικών. Οι κονσέρβες σε λάδι αφήνονταν μέχρι να διαχωριστεί η οργανική από την υδατική φάση. Σε πλάκα πολυαιθυλενίου επαλειμμένη με πηκτή πυρίτιου τοποθετούνται πέντε ml της υδατικής φάσης. Οι πλάκες εμβαπτίζονται σε διάλυμα ακετόνης – υδροξειδίου του αμμωνίου 95:5 για 10 έως 12 min. Για την εμφάνιση των κηλίδων οι συγγραφείς προτείνουν τη χρήση είτε διαλύματος 3% νινυδρίνης σε μεθανόλη, είτε το αντιδραστήριο Pauli. Το αντιδραστήριο Pauli παράγεται μετά από την μείξη 1 μέρους διαλύματος A (1g σουλφανλικού οξέος σε 10 ml πυκνού HCl + 90 ml νερό), 1 μέρους διαλύματος B (υδατικό διάλυμα 5% νιτρικού νατρίου) και 2 μερών διαλύματος C (υδατικό διάλυμα 10% ανθρακικού νατρίου). Το αντιδραστήριο αφήνεται να κρυώσει πριν τη χρήση του. Η συγκεκριμένη μέθοδος υστερεί σαφώς στη δυνατότητα εκτίμησης της συγκέντρωσης ισταμίνης. Ο υπολογισμός του βάρους του δείγματος γίνεται προσεγγιστικά και επομένως δεν είναι ακριβής (Baranowski, 1985b). Η μέθοδος όμως των Schutz και συν. (1976) είναι σαφώς ταχύτερη, δεδομένου ότι ο χρόνος ανάπτυξης του χρωματογραφήματος ήταν σημαντικά μικρότερος.

Ο Murray πρότεινε τη μέθοδο που χρησιμοποιούνταν στο Torry Research Station, London UK (Baranowski, 1985b) και περιελάμβανε το διαχωρισμό της ισταμίνης σε γυάλινες πλάκες επαλειμμένες με πηκτή πυρίτιου. Ποσότητα σάρκας ψαριού ίση με 10 g αναμιγνύεται με 70 ml μεθανόλη και ομογενοποιείται. Μετά την αναγωγή του όγκου σε 100 ml, το διάλυμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 60°C για 15 min. Η πλάκα τοποθετείται σε υδατικό διάλυμα χλωροφόρμιου – μεθανόλης – υδροξειδίου του αμμωνίου (70:30:5) για 20 min και



εμφανίζεται με ψεκάσμο με διάλυμα νινυδρίνης. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 5 mg/100 g δείγματος.

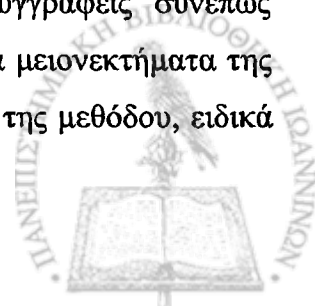
Νεότερες μέθοδοι χρησιμοποιούν την αντίδραση της αμινομάδας με αντιδραστήρια όπως το 1 - διμεθυλαμινοναφθαλινο - 5 σουλφοχλωρίδιο (dansyl - χλωρίδιο) για τη σήμανση της ισταμίνης του δείγματος. Ο Shalaby (1995) προτείνει την παραγωγή με dansyl - χλωρίδιο μετά από εκχύλιση των ιστών με 5% διάλυμα τριχλωροακετοξικού οξέος για τη σήμανση των αμινών. Οι Lara - Guimarães και Pickova (2004), σε μελέτη σύγκρισης διαφόρων πρωτοκόλλων χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, χρησιμοποιούν παραγωγή της ισταμίνης και άλλων βιογενών αμινών με dansyl - χλωρίδιο. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι συγκεκριμένοι συγγραφείς εφαρμόζουν πυκνομέτρηση των κηλίδων των αμινών για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους, ξεπερνώντας έτσι το βασικό μειονέκτημα της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας που είναι η προσεγγιστική εκτίμηση της συγκέντρωσης της ανιχνευόμενης ένωσης.

A.1.8.1.2. Ενζυμικές μέθοδοι

Οι Lerke και συν. (1983) προτείνουν ενζυμική μέθοδο για την ανίχνευση ισταμίνης, η οποία βασίζεται στη χρήση συζευγμένων αντιδράσεων. Η μέθοδος είναι αρκετά απλή και η συγκέντρωση ισταμίνης στο δείγμα είναι δυνατόν να υπολογιστεί με σχετική ακρίβεια.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην κατάλυση της μετατροπής της ισταμίνης σε ιμιδαζολική ακεταλδεΐδη από τη διαμινοξειδάση με ταυτόχρονη παραγωγή H_2O_2 . Το H_2O_2 διασπάται από την υπεροξειδάση της αγριοραπανίδας (horse radish peroxidase) με αποτέλεσμα την έκλυση O_2 . Λόγω της παρουσίας O_2 , το leuco - crystal violet που χρησιμοποιείται ως δείκτης, οξειδώνεται σε κρυσταλλικό ιώδες, το οποίο έχει έντονο ιώδες χρώμα. Η παραγωγή του κρυσταλλικού ιώδους είναι ανάλογη της συγκέντρωσης ισταμίνης. Συνεπώς με την οπτική παρατήρηση ή την εξέταση του δείγματος σε φωτόμετρο υπολογίζεται η συγκέντρωση ισταμίνης του δείγματος. Το όριο ανίχνευσης ισταμίνης με αυτή την μέθοδο είναι ~1 mg/100 g.

Η παραγωγή χρώματος εξαρτάται από το χρόνο της αντίδρασης καθώς και από την ποσότητα της υπεροξειδάσης της αγριοραπανίδας. Επίσης το πρότυπο διάλυμα ισταμίνης παρήγαγε διαφορετικό χρώμα απ' ότι τα δείγματα ψαριών. Οι συγγραφείς συνεπώς προτείνουν τη χρήση μόνο δειγμάτων ψαριών ως θετικών μαρτύρων. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου συνοψίζονται στη σχετικά μικρή ακρίβεια των αποτελεσμάτων της μεθόδου, ειδικά



εάν η εκτίμηση του αποτελέσματος γίνεται με γυμνό οφθαλμό. Παρόλα ταύτα πρόκειται για μια αξιόπιστη και ιδιαίτερα οικονομική μέθοδο (Baranowski, 1985b).

Οι Rodriguez – Jerez και συν. (1994a) πρότειναν κάποιες τροποποιήσεις της μεθόδου των Lerke και συν. (1976). Συγκεκριμένα μετέβαλαν τις συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας αντίδρασης, καθώς και το μήκος κύματος ανίχνευσης σε 580 nm. Οι παρατηρήσεις τους απάντησαν σε κάποιες ασάφειες της αρχικής μεθόδου. Επίσης η τροποποίηση του μήκους κύματος μείωσε την πιθανότητα ψευδών θετικών αποτελεσμάτων λόγω αντίδρασης της διαμινοξειδάσης με άλλες αμίνες.

A.1.8.2. Ποσοτικές μέθοδοι

A.1.8.2.1. Φθορισμομετρική μέθοδος

Το 1997, η AOAC (Association of Official Analytical Chemists) υιοθέτησε τη φθορισμομετρική μέθοδο για την ανίχνευση ισταμίνης (Chambers και Staruskiwicz, 1978; AOAC, 1995c). Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση της ισταμίνης με την *o* – φθαλδιαλδεϋδη προς παραγωγή φθορίζοντος προϊόντος. Η προετοιμασία του δείγματος γίνεται με ομογενοποίηση με μεθανόλη 75 % και διέλευση του εκχυλίσματος από στήλη ανταλλαγής ιόντων. Η τελική εξέταση γίνεται σε φθορισμόμετρο. Η μέθοδος, παρότι οι μετρήσεις της είναι ιδιαίτερα αξιόπιστες, απαιτεί εξειδίκευση και είναι αρκετά χρονοβόρα. Ο μέγιστος αριθμός εκχυλισμάτων μεθανόλης που είναι δυνατόν να εξετασθούν ημερησίως δεν ξεπερνά τα έξι (Baranowski, 1985b).

Μία παρόμοια μέθοδο είχαν προτείνει οι Taylor και συν. (1978a). Η προετοιμασία του δείγματος γίνεται με ομογενοποίηση με μεθανόλη. Το μείγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 60°C για 15 min και φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 15 min. Στο υπερκείμενο προστίθεται Na₂CO₃ και βουτανόλη. Στην οργανική φάση γίνεται η παραγωγή με *o* – φθαλδιαλδεϋδη και μετράται ο φθορισμός του προϊόντος.

A.1.8.2.2. Ανοσοενζυμικές μέθοδοι

Η ισταμίνη είναι σχετικά μικρό μόριο (MB 111) και ως εκ τούτου δεν είναι αντιγονική. Για να προκληθεί ανοσολογική απάντηση, η ισταμίνη πρέπει να συζευχθεί με ένα μεγαλύτερο μόριο – φορέα, που συνήθως είναι μια πρωτεΐνη (Seppa και συν., 1995). Οι Chevrier και συν.



(1986) ανέπτυξαν ανοσοενζυμική μέθοδο ανταγωνισμού (competitive) για την μέτρηση ισταμίνης σε αίμα ανθρώπου και σε ιστούς αρουραίων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην κατασκευή μονοκλωνικού αντισώματος (Guesdon και συν., 1986) μετά από χορήγηση 50 µg ισταμίνης σε θηλυκά ποντίκια BALB/c. Παρόλα ταύτα η εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα τροφίμων παρουσίαζε έλλειψη ειδικότητας και ευαισθησίας. Οι Serrar και συν. (1995) εξέτασαν τις παραμέτρους που θα επέτρεπαν την εφαρμογή ανάλογης ανοσοενζυμικής μεθόδου ανταγωνισμού για την ανίχνευση ισταμίνης σε τρόφιμα με επιτυχή αποτελέσματα.

Τον τελευταίο καιρό όλο και περισσότερα πακέτα έτοιμων αντιδραστηρίων που βασίζονται σε ανοσοενζυμικές τεχνικές ανίχνευσης ισταμίνης διατίθενται στην αγορά. Τα kit ELISA χαρακτηρίζονται από καλή επαναληψιμότητα και μικρό αριθμό ψευδώς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων (Lehane και Olley, 2000). Παρότι είναι σχετικά ακριβά για την ανίχνευση συγκεντρώσεων ισταμίνης μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε εργαστήρια ελέγχου, είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε περιπτώσεις μικρού αριθμού δειγμάτων ή στην επιδημιολογική διερεύνηση περιστατικών. Τα εμπορικά διαθέσιμα kit ELISA για ανίχνευση ισταμίνης σε τρόφιμα αναφέρονται στον Πίνακα 11.



Πίνακας 11. Εμπορικά διαθέσιμα ανοσοενζυμικά kit ανίχνευσης ισταμίνης σε αλιεύματα

Εμπορική ονομασία του kit	Ευαισθησία	Χρόνος εκτέλεσης	Προμηθευτής
ALERT [®] for Histamine	2,5 ppm	35 min	Neogen Corporation. Web: www.neogen.com
Histamarine Test Kit (εγκεκριμένο από AOAC)	0,5 ppm. Ποσοτική: 1 έως 500 ppm	1 h	Immunotech. Web: www.immunotech.fr
EIA for Histamine in Fish Extract, K1-HTM	2,5 ppm. Ποσοτική: 1 έως 50 ppm	90 min	Immuno-Diagnostic Reagents. Web: www.tiora.net/~idr/
EIA for Histamine Fishmeal and Bonemeal, K2-HTM	5 ppm, ποιοτική	35 min	Immuno-Diagnostic Reagents. Web: www.tiora.net/~idr/
EIA for Histamine in Raw and Canned fish, K3-HTM	5 ppm, ποιοτική	35 min	Immuno-Diagnostic Reagents. Web: www.tiora.net/~idr/
HistaMeter	0 – 50 ppm, ποιοτική	1 h	Biomedix
HistaQuant	Ποσοτική: 0 – 500 ppm	1,5 h	Biomedix
RIDASCREEN [®] Histamin R1602	2,5 ppm. Ποσοτική	2-5/6h	R-Biopharm, Inc. Web: www.rbiopharm.com
RidaQuick Histamin (R1603-96 Wells)	20 ppm. Ποσοτική	12 min	R-Biopharm, Inc. Web: www.r-biopharm.com/
Transia Tube <i>Histamine</i>		1 h	Diffchamb AB. Web: www.diffchamb.se
Veratox [®] for Histamine	2,5 ppm. Ποσοτική από 0 έως 50 ppm	35 min	Neogen Corporation . Web: www.neogen.com

A.1.8.2.3. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

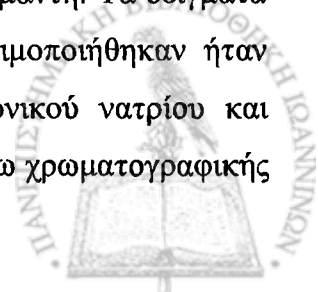
Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση ισταμίνης με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Γενικά είναι δυνατόν να χωριστούν σε αυτές, στις οποίες ανιχνεύεται ο φθορισμός του παράγωγου της ισταμίνης με ο - φθαλδιαλδεϋδη και σε αυτές στις οποίες ανιχνεύεται η απορρόφηση φωτός του παραγώγου της ισταμίνης με dansyl - χλωρίδιο.

Οι Mietz και Karmas (1978) αναφέρουν μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανίχνευση βιογενών αμινών μετά από παραγωγή με dansyl - χλωρίδιο. Τα δείγματα εκχυλίζονται με τριχλωροξικό οξύ. Η στήλη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντίστροφης φάσης, μεγέθους 300 x 4,6 mm, με υλικό πλήρωσης Bondapak C₁₈. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ακετονιτρίλιο με υδατικό διάλυμα 0,02 N οξικού οξέος (1:9) και υδατικό διάλυμα 0,02 N οξικού οξέος, ακετονιτρίλιο και μεθανόλη (2:9:9) σε βαθμίδωση. Η διάρκεια της διέλευσης των διαλυτών ορίστηκε στα 30 min και γινόταν με ρυθμό ροής 1 ml/min. Τα 1-διμεθυλαμινοναφθαλινο-5-σουλφοπαράγωγα (dansyl παράγωγα) των βιογενών αμινών απορροφούν ισχυρά στα 254 nm. Το όριο ευαισθησίας της μεθόδου για διάφορα είδη ψαριών κυμαίνεται από 0,18 έως 1,58 ppm.

Παρόμοια μέθοδο αναφέρουν οι Hui και Taylor (1983). Τα δείγματα εκχυλίζονται με μεθανόλη. Η ανίχνευση των dansyl παραγώγων γίνεται με UV - Vis ανιχνευτή στα 254 nm μετά από διέλευση με ρυθμό ροής 1,5 ml/min για 18 min, από χρωματογραφική στήλη διαστάσεων 250 x 4,6 mm, με υλικό πλήρωσης Ultrasphere - ODS 5 μm. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεθανόλη - ακετονιτρίλιο (1:1) και υδατικό διάλυμα 0,33 mM φωσφορικού οξέος σε βαθμίδωση. Το όριο ευαισθησίας της μεθόδου ήταν 5 mg/100g.

Οι Malle και Valle (1996) εξέτασαν διαφορετικά πρωτόκολλα για την εκχύλιση των βιογενών αμινών από ψάρια. Επίσης εξέτασαν και διαφορετικές χρωματογραφικές συνθήκες για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αυτών. Γενικά χρησιμοποίησαν διάφορους διαλύτες σε βαθμίδωση. Η σήμανση των αμινών γίνεται με παραγωγή με dansyl - χλωρίδιο. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαστάσεων 300 x 4,5 mm, με υλικό πλήρωσης Kromasil C₁₈ 5μm και ο ρυθμός διέλευσης 1 ml/min.

Οι Veciana - Nogues και συν. (1995) αναφέρουν μέθοδο για τον προσδιορισμό βιογενών αμινών σε αλιεύματα μετά από παραγωγή με φθορίζοντα σημαντή. Τα δείγματα εκχυλίζονται με διάλυμα υπερχλωρικού οξέος. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υδατικό διάλυμα 0,1 M οξικού νατρίου και 10 mM οκτανοσουλφονικού νατρίου και ακετονιτρίλιο σε βαθμίδωση. Η διέλευση γίνεται με ρυθμό 1 ml/min μέσω χρωματογραφικής



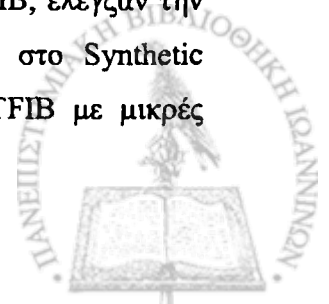
στήλης διαστάσεων 150 x 4,6 mm, με υλικό πλήρωσης Novapak C₁₈ 4 μm. Η παραγωγή γίνεται εν σειρά μετά τη χρωματογραφική στήλη με διάλυμα ο - φθαλδιαλδεύδης. Η ανίχνευση γίνεται με φθορισμομετρικό ανιχνευτή σε διέγερση στα 340 nm και εκπομπή στα 445 nm. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου για την ισταμίνη είναι 0,25 mg/kg.

A.1.8.3. Καλλιεργητικές μέθοδοι ανίχνευσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων

Όπως έχει αναφερθεί, η παραγωγή ισταμίνης στα ψάρια οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παραγωγή της αποκαρβοξυλάσης της ιστιδίνης από διάφορα βακτήρια. Για αυτό το λόγο έχουν γίνει σοβαρές προσπάθειες για την ανίχνευση και καταμέτρηση των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων. Για την πραγματοποίηση αυτών των μελετών ακολουθήθηκαν δύο οδοί: α) χρήση ενός βασικού υποστρώματος που επιτρέπει στα βακτήρια να παράγουν βιογενείς αμίνες, το οποίο καθιστά δυνατή τη μέτρηση ισταμίνης στο καλλιεργητικό υλικό και β) η σύνθεση διαφοροποιητικών υποστρωμάτων που, συνήθως με κάποιο δείκτη pH, διαφοροποιούν τα βακτήρια που παράγουν ισταμίνη από τα υπόλοιπα βακτήρια της μικροβιακής χλωρίδας.

Τα πλεονεκτήματα της πρώτης μεθόδου η οποία με την ανίχνευση της ισταμίνης ουσιαστικά ταυτοποιεί τα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια είναι αδιαμφισβήτητα: εάν ανιχνεύεται ισταμίνη σε καθαρή καλλιέργεια βακτηρίου, το βακτηριακό στέλεχος που καλλιεργήθηκε παράγει ισταμίνη. Όμως πρόκειται για χρονοβόρα και εξειδικευμένη μέθοδο, που δεν επιτρέπει την καταμέτρηση των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων από ένα εργαστήριο ελέγχου τροφίμων. Αντίθετα, η καταμέτρηση ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων είναι δυνατόν να εκτελεστεί στο πλαίσιο της εξέτασης ρουτίνας με τη χρήση ενός διαφοροποιητικού υποστρώματος. Ο ενοφθαλμισμός σε διαφοροποιητικό υπόστρωμα επιτρέπει την καταμέτρηση των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων και την κατά προσέγγιση εκτίμηση της πιθανότητας παραγωγής ισταμίνης στο τρόφιμο.

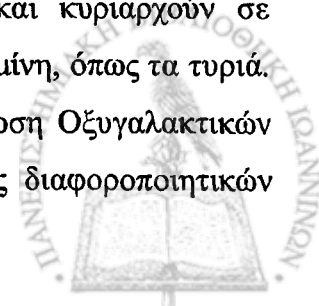
Οι πρώτες προσπάθειες μελέτης της ικανότητας παραγωγής αποκαρβοξυλασών από βακτήρια έγιναν με τη χρήση υποστρωμάτων που προσομοίαζαν τη χημική σύνθεση των ψαριών. Ο έλεγχος της παραγωγής ισταμίνης γινόταν με διάφορες αναλυτικές μεθόδους. Έτσι ο Ferenčík (1970) χρησιμοποίησε εκχύλισμα αποστειρωμένης σάρκας τόννου (Tuna Fish Infusion Broth, TFIB) για τον έλεγχο παραγωγής ισταμίνης από βακτηριακά στελέχη. Οι Omura και συν. (1978), αφού απομόνωσαν βακτηριακά στελέχη από το TFIB, έλεγξαν την ικανότητα αποκαρβοξυλίωσης αμινοξέων των απομονωθέντων στελεχών στο Synthetic Medium (SYN). Οι Middlebrooks και συν. (1998) χρησιμοποίησαν το TFIB με μικρές



διαφοροποιήσεις, όπως προσθήκη Bromocresol purple και χρήση κιτρινόστικτου σκουμπριού (*Scomberomorus maculatus*) για την παρασκευή του. Οι Wei και συν. (1990) χρησιμοποίησαν TFIB με προεμπλουτισμό σε Trypticase Soy Broth στο οποίο προσέθεσαν ιστιδίνη 2% (TSBH).

Ο Møeller (1954) πρότεινε ένα συνθετικό υπόστρωμα για την εκτίμηση της παραγωγής της αποκαρβοξυλάσης της ιστιδίνης, καθώς και αποκαρβοξυλασών άλλων αμινοξέων (Møeller decarboxylase broth). Οι Rodriguez – Herrez και συν. (1994b) χρησιμοποίησαν το Møeller decarboxylase broth για την αναγνώριση βακτηρίων που παράγουν ισταμίνη, πουτρεσκίνη και καδαβερίνη, προσθέτοντας το κατάλληλο αμινοξύ. Το συγκεκριμένο υπόστρωμα ουσιαστικά είναι ένα βασικό υπόστρωμα στο οποίο προστίθεται το ανάλογο αμινοξύ και δείκτης pH (bromocresol purple και cresol red) (Bover – Cid και Holzapfel, 1999). Οι Niven και συν. (1981) τροποποίησαν το Møeller decarboxylase broth έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων από αλιεύματα (Niven medium). Συγκεκριμένα κατέργησαν το cresol red ως δείκτη pH και τη φωσφορική πυριδοξάλη, και μείωσαν το pH του υποστρώματος σε 5,30. Οι Yoshinaga και Frank (1982) τροποποίησαν το Niven medium (Modified Niven medium) προσπαθώντας να εξαλείψουν προβλήματα του υποστρώματος, όπως το μειωμένο pH, που πιθανώς είναι ανασταλτικός παράγοντας για την ανάπτυξη ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων που είναι ευαίσθητα σε αυτό, όπως τα *Clostridium* spp. Διάφορες παραλλαγές του Niven medium και του Modified Niven medium έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων σε αλιεύματα (Smith και συν., 1982· Taylor και Speckhard, 1983· López – Sabater και συν., 1994· Hernández – Herrero και συν., 1999). Οι Chen και συν. (1989) βασιζόμενοι στην αρχική σύνθεση του Niven medium εξέτασαν διαφοροποιήσεις στη συγκέντρωση ιστιδίνης, στο pH και στο δείκτη pH αντικαθιστώντας το bromocresol purple με phenol red, επιβεβαιώνοντας ως αποτελεσματικότερη τη σύνθεση του Niven medium.

Τα διαφοροποιητικά υποστρώματα που αναφέρθηκαν έχουν ως κύρια κατεύθυνση τη διαφοροποίηση ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων, που ανήκουν στην οικογένεια των Εντεροβακτηριακών. Δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην ανίχνευση των Οξυγαλακτικών βακτηρίων (Bover – Cid και Holzapfel, 1999). Παρότι οι κύριοι παραγωγείς ισταμίνης στα αλιεύματα είναι βακτήρια που ανήκουν στα Εντεροβακτηριακά, τα Οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν ικανούς παραγωγείς ισταμίνης και κυριαρχούν σε τρόφιμα που έχουν ενοχοποιηθεί σε περιστατικά δηλητηρίασης από ισταμίνη, όπως τα τυριά. Οι Joosten και Northolt (1989) πρότειναν υπόστρωμα για την απομόνωση Οξυγαλακτικών βακτηρίων που παράγουν ισταμίνη. Εκτός αυτών διάφορες συνθέσεις διαφοροποιητικών



υποστρωμάτων έχουν χρησιμοποιήσει οι Maijala (1993) και οι Bover – Cid και Holzapel (1999). Η σύνθεση των κυριότερων διαφοροποιητικών υποστρωμάτων για την ανίχνευση γενικά ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων στα αλιεύματα αναφέρεται στον Πίνακα 12, ενώ η σύνθεση των αντίστοιχων υποστρωμάτων για την ανίχνευση Οξυγαλακτικών βακτηρίων αναφέρεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 12. Σύνθεση των κυριότερων διαφοροποιητικών υποστρωμάτων για ανίχνευση ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων σε αλιεύματα

Συστατικά (g/L)	Moeller (1954)	Niven και συν. (1981)	Yoshinaga και Frank (1982)
Τρυπτόνη	0,5	0,5	0,5
Yeast extract		0,5	0,5
Meat extract	0,5		
NaCl		0,5	0,5
Γλυκόζη	0,05		
CaCO ₃	0,1	0,1	
Φωσφορική πυριδοξάλη	0,0005		
Αμινοξύ	0,5 – 1,0	2,7 (ιστιδίνη)	2 (ιστιδίνη)
Bromocresol purple	0,001	0,006	
Cresol red	0,0005		0,02
Άγαρ		2	1,5
Ph	6,00	5,30	6,50
Εφαρμογή	Εντεροβακτηριακά	Εντεροβακτηριακά από αλιεύματα	Εντεροβακτηριακά από αλιεύματα



Πίνακας 13. Σύνθεση των κυριότερων διαφοροποιητικών υποστρωμάτων για ανίχνευση Οξυγαλακτικών ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων

Ευστατικά (g/L)	Choudhury και συν. (1990)	Joosten and Northold (1989)	Maijala (1993)	Bover – Cid και Holzapfel (1999)
Τρυπτόνη	0,5	0,5	0,5	0,5
Yeast extract	0,5	0,5	0,4	0,5
Meat extract			0,8	0,5
NaCl	0,5	0,5		0,25
Γλυκόζη	0,05	0,1		0,05
Tween 80		0,05	0,05	0,1
MgSO ₄		0,02	0,02	0,02
MnSO ₄		0,005	0,005	0,005
FeSO ₄		0,004	0,004	0,004
Κιτρικό αμμώνιο				0,2
Θειαμίνη				0,001
K ₂ PO ₄				0,2
CaCO ₃		0,01	0,01	0,01
Φωσφορική πυριδοξάλη				0,005
Αμινοξύ	0,5	2	2	1
Bromocresol purple	0,005	0,006	0,006	0,006
Άγαρ	2	2	2	2
Ph	5,50	5,00	5,30	5,30
Εφαρμογή	<i>L. buchneri</i> , <i>O. oenii</i>	Λακτοβάκιλλοι από τυριά	Οξυγαλακτικά βακτήρια από προϊόντα κρέατος	Οξυγαλακτικά βακτήρια και Εντεροβακτη- ριακά

Πηγή: Bover – Cid και Holzapfel (1999)

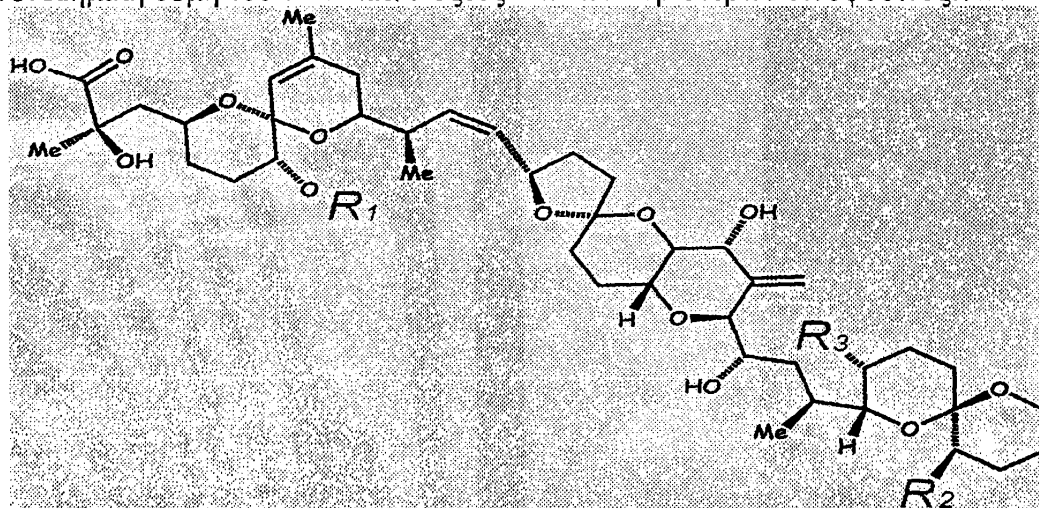


A.2. Διαρροϊκή δηλητηρίαση από κατανάλωση δίθυρων

A.2.1. Αιτιοπαθογένεια

Η διαρροϊκή δηλητηρίαση από κατανάλωση δίθυρων (ή Διαρροϊκή δηλητηρίαση από κατανάλωση τοξικών οστρακοειδών, ή Διαρροϊκή δηλητηρίαση από θαλασσινά), προκαλείται από δίθυρα (μύδια, στρείδια, χτένια) που περιέχουν τοξίνες. Οι τοξίνες αυτές ανευρίσκονται σε τοξικές συγκεντρώσεις σχεδόν αποκλειστικά στα μύδια, λόγω του τρόπου διατροφής αυτών, η οποία περιλαμβάνει διήθηση μεγάλων ποσοτήτων νερού. Οι συγκεκριμένες τοξίνες είναι γνωστές ως τοξίνες της διαρροϊκής δηλητηρίασης από θαλασσινά (DSP toxins, **Diarrhetic Seafood Poisoning**) και είναι θερμοάντοχοι όξινοι πολυαιθέρες, όπως το οκαδαϊκό οξύ και οι παράγωγες ενώσεις του, που ονομάζονται δινοφουσιτοξίνες (Draisci και συν., 1996). Μέχρι σήμερα είναι γνωστές επτά δινοφουσιτοξίνες, οι DTX - 1, DTX - 2_a, DTX - 2_b, DTX - 3, DTX - 4, DTX - 5_a και DTX - 5_b. Οι κύριες τοξίνες που προκαλούν την DSP δηλητηρίαση είναι το οκαδαϊκό οξύ, η DTX - 1 και DTX - 2, ενώ οι υπόλοιπες τοξίνες φαίνεται να είναι είτε πρόδρομες ενώσεις ή μεταβολίτες αυτών (James και συν., 1997· Yasumoto, 2000).

Εικόνα 3. Χημική δομή του οκαδαϊκού οξέος και των κυριότερων δινοφουσιτοξινών



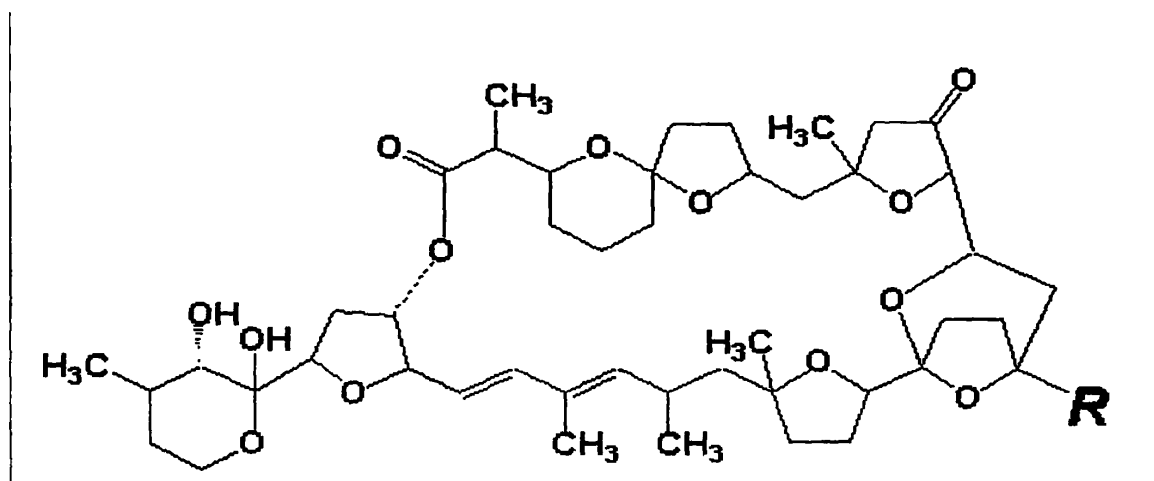
	R ₁	R ₂	R ₃
Οκαδαϊκό οξύ (OA)	H	H	Me
Δινοφουσιτοξίνη - 1 (DTX-1)	H	Me	Me
Δινοφουσιτοξίνη - 2 (DTX-2)	H	Me	H
7-Ο-Ακυλιωμένα παράγωγα	CH ₃ CO-		

Πηγή: Van Egmond και συν., 2004

Παράλληλα με τις δινοφουσιτοξίνες, και άλλες τοξίνες, όπως οι πεκτενοτοξίνες και οι γεσσοτοξίνες, ανευρίσκονται σε τοξικά μύδια (Draisci και συν., 2000). Οι πεκτενοτοξίνες και οι γεσσοτοξίνες εκχυλίζονται μαζί με τις δινοφουσιτοξίνες με τις συνήθεις μεθόδους ελέγχου των μυδίων, λόγω της λιπόφιλης φύσης τους.

Οι πεκτενοτοξίνες είναι ουδέτερες πολυαιθερικές λακτόνες. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί οκτώ πεκτενοτοξίνες, οι PTX - 1, PTX - 2, PTX - 3, PTX - 4, PTX - 5, PTX - 6, PTX - 7 και PTX - 10 (Draisci και συν., 2000; Burgess και Shaw, 2002). Η PTX - 1 είναι ηπατοτοξική και προκαλεί ταχεία νέκρωση των ηπατοκυττάρων με παθολογική δράση ανάλογη της φαλοϊδίνης (Gestal - Otero, 2000).

Εικόνα 4. Χημική δομή των πεκτενοτοξινών



	R	C-7
Πεκτενοτοξίνη - 1	CH ₂ OH	R
Πεκτενοτοξίνη - 2	CH ₃	R
Πεκτενοτοξίνη - 3	CHO	R
Πεκτενοτοξίνη - 4	CH ₂ OH	S
Πεκτενοτοξίνη - 6	COOH	R
Πεκτενοτοξίνη - 7	COOH	S

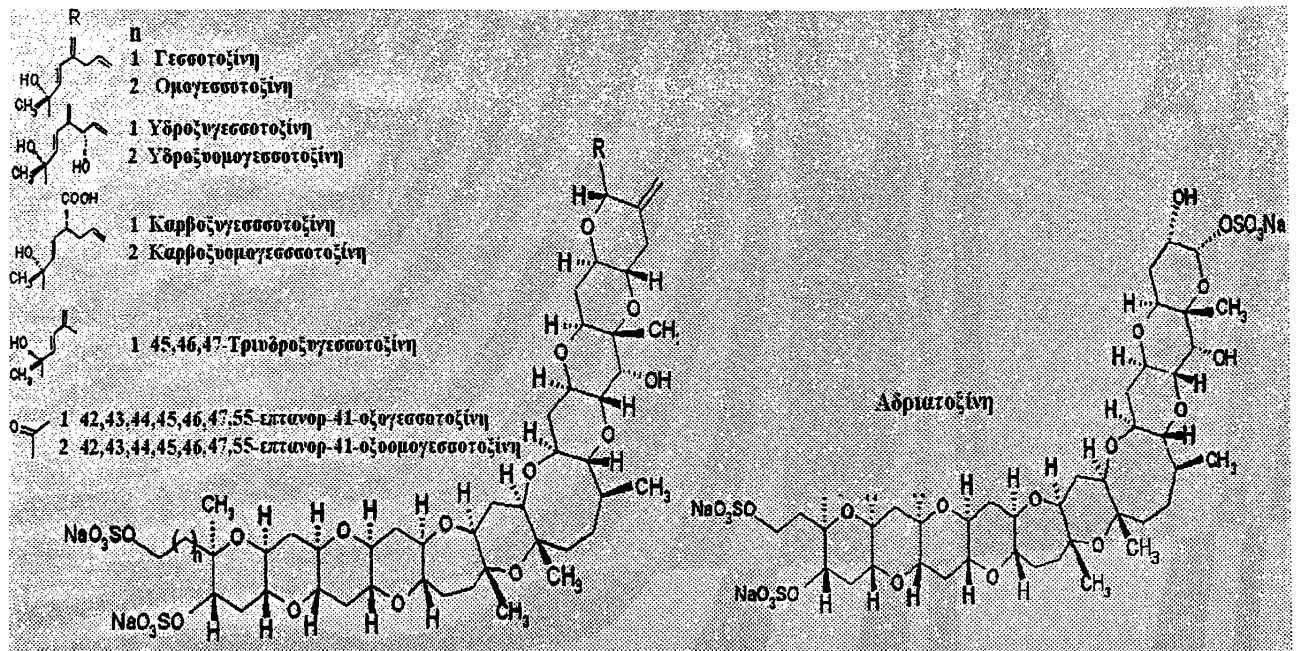
Πηγή: Van Egmond και συν., 2004

Οι γεσσοτοξίνες είναι ενώσεις χημικά συγγενείς με τις σιγκουατοξίνες και τις μπρεβετοξίνες. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πέντε τοξίνες, οι YTX, 45 - υδροξυYTX, 45, 46, 47 - τριυδροξυYTX, ομοYTX, 45 - υδροξυομοYTX και αδριατοξίνη (Draisci και συν., 2000). Οι γεσσοτοξίνες προκαλούν καρδιακή βλάβη σε ποντίκια, με εξοίδηση των



καρδιακών κυττάρων, ενώ δεν προκαλούν βλάβες σε όργανα όπως το ήπαρ, το πάγκρεας, οι πνεύμονες και τα επινεφρίδια (Gestal – Otero, 2000).

Εικόνα 5. Χημική δομή των γεσσοτοξινών



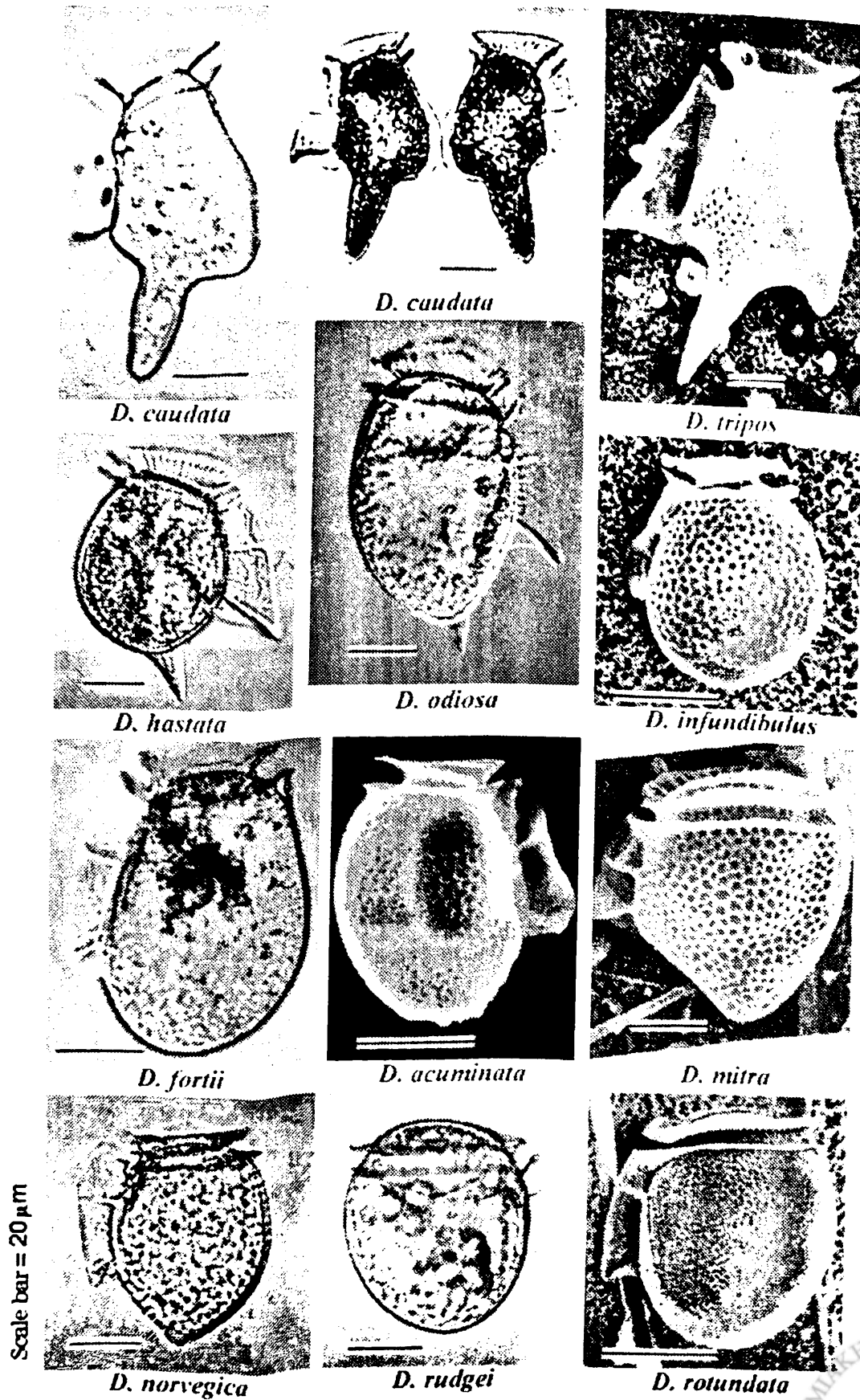
Πηγή: Van Egmond και συν., 2004.

Οι πεκτενοτοξίνες και οι γεσσοτοξίνες κατά την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση σε πειραματόζωα (ποντίκια), προκαλούν τοξικά συμπτώματα. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων τους αρχικά περιλήφθηκαν στις τοξίνες του διαρροϊκού συνδρόμου των δίθυρων. Όμως τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί η κατάταξή τους σε ξεχωριστή κατηγορία τοξινών, λόγω της απουσίας διαρροϊκής δράσης των συγκεκριμένων τοξινών στα θηλαστικά (Draisci και συν., 2000).

Το οκαδαϊκό οξύ και οι δινοφυσιτοξίνες παράγονται από δινομαστιγωτά (Εικόνες 3 και 4) των ειδών *Dinophysis* spp. (*D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. fortii*, *D. hastata*, *D. mitra*, *D. norvegica*, *D. rotundata*, *D. sacculus*, *D. tripos*) (Lee και συν., 1989' Masselin και συν., 1992' Hallegraef, 1997' Yasumoto, 2000) και *Prorocentrum* spp. (*P. arenarium*, *P. belizeanum*, *P. concavum*, *P. faustiae*, *P. hoffmannianum*, *P. lima*, *P. maculosum*) (Morton και Faust, 1997' Morton και συν., 1998' Van Dolah, 2000' Ten-Hage και συν., 2000).

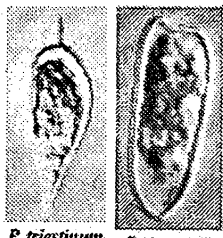


Εικόνα 6. Τοξικά δινομαστιγωτά *Dinophysis* spp.

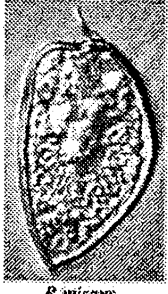


Εικόνα 7. Τοξικά δινομαστιγωτά *Prorocentrum* spp.

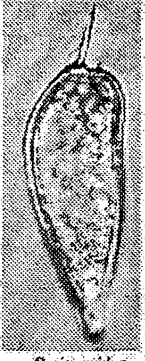
Prorocentrum



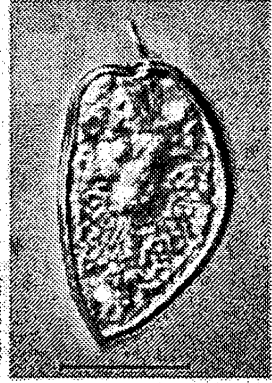
P. triestinum *P. dentatum*



P. micans

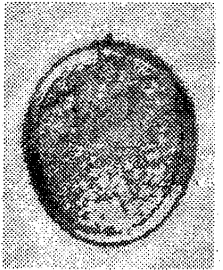
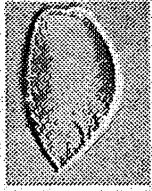
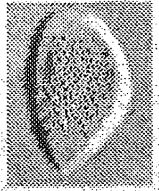
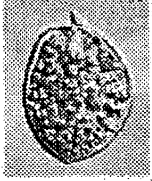


P. sigmoides

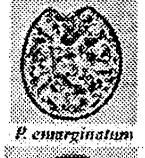


Scale bar: 10 μm

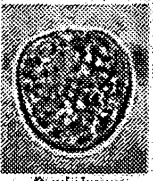
Prorocentrum micans



P. compressum



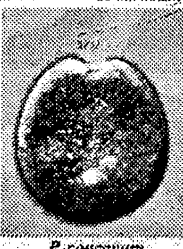
P. emarginatum



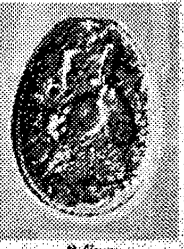
P. minimum



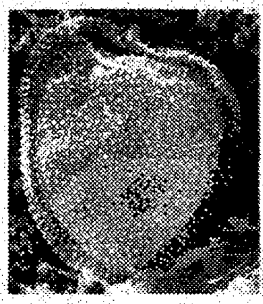
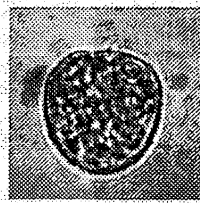
P. mexicanum



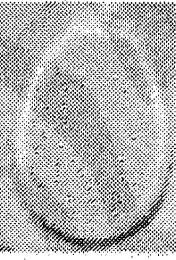
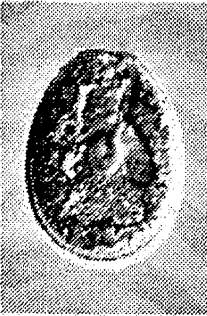
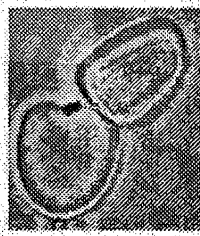
P. concavum



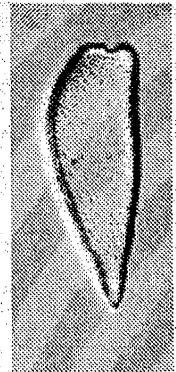
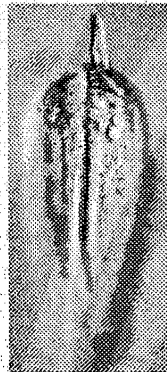
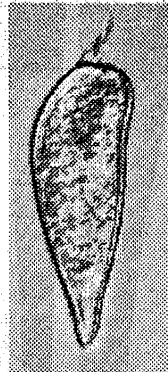
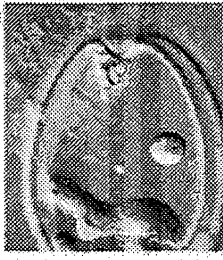
P. lima



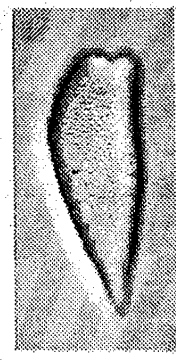
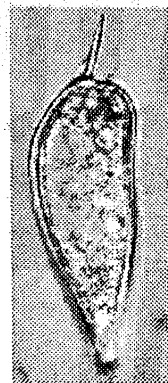
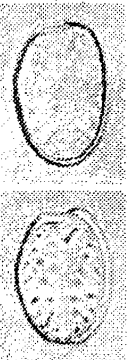
Prorocentrum minimum



Prorocentrum lima

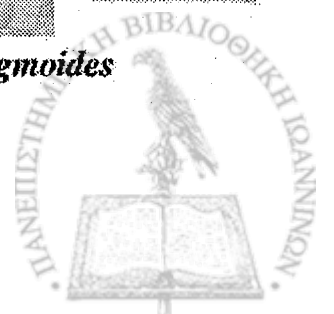


Prorocentrum mexicanum



Prorocentrum sigmoides

Πηγή: <http://dinos.anesc.u-tokyo.ac.jp/>



Τα δινομαστιγωτά έχουν σχεδόν παγκόσμια εξάπλωση. Μαζί με άλλα μικροφύκη αποτελούν τη βάση της θαλάσσιας τροφικής αλυσίδας. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των πληθυσμών μικροφυκών στα θαλάσσια ύδατα είναι: α) τα αυξημένα θρεπτικά συστατικά, λόγω εκβολής αστικών και βιομηχανικών λυμάτων, β) οι μεταβολές στη θερμοκρασία του νερού που ευνοούν την εγκύστωση και εξωκύστωσή τους, γ) η μειωμένη αλατότητα του νερού, δ) η αύξηση της φωτοπεριόδου, και ε) τα ήρεμα ύδατα (Gestal – Otero, 2000· Caroppro και συν., 2001).

Η συγκέντρωση των τοξινών στη σάρκα των μυδιών δεν εξαρτάται από τον αριθμό των δινομαστιγωτών στα θαλάσσια ύδατα. Έτσι τα τοξικά δινομαστιγωτά, ακόμα και όταν βρίσκονται σε πολύ μικρούς αριθμούς (< 200 κύτταρα/L) είναι δυνατόν να προκαλέσουν τη συγκέντρωση δινοφουσιτοξινών σε τοξικά επίπεδα στα μύδια (Burgess και Shaw, 2001). Αντίθετα, η παρουσία τοξικών δινομαστιγωτών ακόμα και σε μεγάλους αριθμούς δεν προκαλεί απαραίτητα τη συσσώρευση τοξικών συγκεντρώσεων διαρροϊκών τοξινών στα μύδια, ειδικά στην περίπτωση που ο αριθμός των μη τοξικών δινομαστιγωτών είναι μεγάλος. Παρόλα ταύτα τοξικές συγκεντρώσεις τοξινών στη σάρκα των μυδιών συνήθως ανευρίσκονται όταν ο αριθμός των δινομαστιγωτών κυμαίνεται μεταξύ 1000 και 2000 κυττάρων/L νερού (Aune και Yndestad, 1993).

A.2.1.1. Βιολογικές δράσεις οκαδαϊκού οξέος και δινοφουσιτοξινών στα θηλαστικά

Οι δινοφουσιτοξίνες είναι αναστολείς των πρωτεϊνικών φωσφατασών της σερίνης και της θρεονίνης. Οι συγκεκριμένες φωσφατάσες αποτελούν σημαντικά ένζυμα για τη διατήρηση της ζωής και ρυθμίζουν ποικιλία μεταβολικών διεργασιών στον οργανισμό, μεταξύ των οποίων τη σήμανση των ευκαρυωτικών κυττάρων, με βάση την οποία ρυθμίζεται μεγάλο εύρος διεργασιών, όπως ο μεταβολισμός και η ιοντική ισορροπία του κυττάρου (Rossini, 2000).

Η αναστολή της δράσης των πρωτεϊνικών φωσφατασών έχει ως αποτέλεσμα την υπερφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και των διαύλων ιόντων στο εντερικό επιθήλιο. Η αδρανοποίηση των ιοντικών διαύλων έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή του ισοζυγίου νερού και την απώλεια υγρών από το γαστρεντερικό σωλήνα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση οσμωτικής διάρροιας. Το οκαδαϊκό οξύ εμφανίζεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στο ήπαρ και στον εντερικό σωλήνα. Η LD₅₀ του οκαδαϊκού οξέος σε ποντίκια είναι 192 μg/kg ip (Matias και συν., 1999· Burgess και Shaw, 2001).



Η χρόνια λήψη μικρών ποσοτήτων αυτών των τοξινών έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους στα όργανα – στόχους σε τοξικές συγκεντρώσεις. Η συσσώρευση των δινοφουσιτοξινών στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου προκαλεί την εκφυλιστική αλλοίωση του εντερικού επιθηλίου.

Εκτός από την ηπατοτοξικότητα που παρουσιάζουν αυτές οι τοξίνες, το οκαδαϊκό οξύ και οι δινοφουσιτοξίνες αποτελούν ισχυρότατους καρκινογόνους παράγοντες (Rossini, 2000· Burgess και Shaw, 2001). Ειδικότερα το οκαδαϊκό οξύ είναι ισχυρά μεταλλαξιογόνο σε πνευμονικά κύτταρα κινέζικου ινδικού χοιριδίου. Ο μηχανισμός της μετάλλαξης μάλλον οφείλεται στην υπερφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA (Aune και Yndestad, 1993). Λόγω της άθροισής τους σε συγκεκριμένους ιστούς, όπως το ήπαρ, και της έντονης μεταλλαξιογόνου δράσης τους, η χρόνια πρόσληψη υποκλινικών συγκεντρώσεων δινοφουσιτοξινών είναι δυνατόν να έχει σοβαρές επιπτώσεις για την υγεία των καταναλωτών.

Οι Hokama και συν. (1989) μελέτησαν την επίδραση του οκαδαϊκού οξέος σε μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος *in vitro* μέσω της επίδρασης στη σύνθεση της ιντερλευκίνης – 1. Συγκεντρώσεις οκαδαϊκού οξέος μεταξύ 0,1 και 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ προκάλεσαν αναστολή της παραγωγής IL – 1 από τα μονοκύτταρα, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τα κύτταρα νεκρώνονταν. Αυτή η ανοσοκατασταλτική δράση του οκαδαϊκού οξέος ήταν αναστρέψιμη με προσθήκη αντισωμάτων έναντι του οκαδαϊκού οξέος.

A.2.2. Επιδημιολογία

A.2.2.1. Ιστορική ανασκόπηση

Στην Παλαιά Διαθήκη το πρώτο από τα δεινά που έπληξαν την Αίγυπτο περιγράφεται ως «²¹ καί εποίησαν ούτως Μωυσής καί Ααρών, καθάπερ ένετείλατο αυτοῖς Κύριος· καί έπάρας τῆ ράβδω αὐτοῦ έπάταξε το ὕδωρ τό έν τῷ ποταμῷ εἰς αἷμα. ²² καί οἱ ιχθύες οἱ έν τῷ ποταμῷ έτελεύτησαν, καί έπώζεσεν ὁ ποταμός, καί οὐκ ήδύναντο οἱ Αἰγύπτιοι πιεῖν ὕδωρ έκ τοῦ ποταμοῦ, καί τό αἷμα έν πάσῃ γῆ Αἰγύπτου» (Εξοδος, Κεφάλαιο Ζ', 21 – 22).

Αυτή η αναφορά θα μπορούσε κάλλιστα να περιγράφει μια κόκκινη παλίρροια λόγω ανάπτυξης δινομαστιγιωτών.



Από αρχαιοτάτων χρόνων υπάρχουν αναφορές σε δηλητηριάσεις που οφείλονται σε κατανάλωση μυδιών. Στην Προκολομβιανή Αμερική ήταν γνωστοί οι κίνδυνοι από κατανάλωση τοξικών μυδιών. Η κατανάλωση μυδιών απαγορεύονταν όταν η θάλασσα εμφάνιζε κόκκινο χρωματισμό ή παρουσίαζε φωσφορισμό τη νύχτα. Για να αντιμετωπίσουν αυτόν τον κίνδυνο τοποθετούσαν νυχτοφύλακες, που επιτηρούσαν τα νερά (Gestal – Otero, 2000). Αυτό το μέτρο είναι δυνατόν να θεωρηθεί ως η πρώτη εφαρμογή προγράμματος επιτήρησης.

Η πρώτη επιστημονική αναφορά σε δηλητηρίαση από κατανάλωση δίθυρων αναγράφεται στο βιβλίο “Ephémérides de curieux de la nature” του 1689 (Gestal – Otero, 2000). Όμως η πρώτη γραπτή αναφορά επιδημίας αφορά επιδημική έξαρση στη Βρετανική Κολούμπια του Καναδά το 1793 (Gestal – Otero, 2000).

Η πρώτη σύγχρονη αναφορά στη διαρροϊκή δηλητηρίαση από δίθυρα, αφορά επιδημική έξαρση στην περιοχή Easterscheldt της Ολλανδίας το 1961. Τον ίδιο χρόνο αναφέρονται και άλλα κρούσματα στη γειτονική περιοχή του Waddensea. Το 1971 εμφανίστηκε για δεύτερη φορά επιδημική έξαρση στην περιοχή του Easterscheldt, που έπληξε 100 άτομα. Υπήρχε επίσης αναφορά σε γαστρεντερική νόσο λόγω κατανάλωσης μυδιών στη Νορβηγία το 1968. Τα επόμενα χρόνια, αρκετά περιστατικά διαρροϊκής δηλητηρίασης από κατανάλωση μυδιών περιγράφηκαν στην περιοχή του Oslofjord της Νορβηγίας. Όλα αυτά τα περιστατικά χαρακτηρίστηκαν ως «δηλητηρίαση άγνωστης αιτιολογίας από κατανάλωση μυδιών» (Gestal – Otero, 2000).

Το 1976 οι Yasumoto και συν. (1978) ταυτοποίησαν για πρώτη φορά το αίτιο της νόσου. Συγκεκριμένα οι Yasumoto και συν. (1978) περιγράφουν δεκατέσσερις επιδημικές εξάρσεις σε περιοχές της Ιαπωνίας μεταξύ 1976 και 1977, με πρώτη αυτή του Ιουνίου του 1976 στις περιοχές Motoshi και Towa. Τα υπεύθυνα τρόφιμα και στις δεκατέσσερις επιδημικές εξάρσεις ήταν μύδια και χτένια. Τα περιστατικά εμφανίστηκαν τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο. Τα συμπτώματα των ασθενών ήταν διάρροια (92%), ναυτία (80%), έμετος (79%) και κοιλιακό άλγος (53%).

A.2.2.2. Ευρώπη

Στη Γαλλία κατά τη δεκαετία του '80 αναφέρθηκαν διάφορες επιδημικές εξάρσεις διαρροϊκής δηλητηρίασης από κατανάλωση δίθυρων. Στην περιοχή Loire – Atlantique και στην Νορμανδία το 1983 αναφέρθηκαν δύο επιδημίες με 3300 και 150 κρούσματα, το 1984



άλλες δύο με 70 και 200 κρούσματα, το 1985 αναφέρθηκαν μόνον σποραδικά κρούσματα, ενώ το 1987 καταγράφηκαν 2000 κρούσματα (Gestal – Otero, 2000).

Στη Νορβηγία η πρώτη επιβεβαιωμένη επιδημική έξαρση διαρροϊκής δηλητηρίασης από κατανάλωση δίθυρων οφειλόταν σε κατανάλωση μυδιών που αλιεύτηκαν στην νοτιοδυτική ακτή της Νορβηγίας και περιείχαν τοξίνη που παράχθηκε από δινομαστιγωτά του είδους *Dinophysis* spp. Η παρουσία της τοξίνης στα μύδια διήρκεσε για μεγάλο χρονικό διάστημα (από τον Οκτώβριο του 1984 έως τον Απρίλιο του 1985) κατά το οποίο νόσησαν περίπου 400 άτομα (Gestal – Otero, 2000). Παράλληλα με αυτή την επιδημική έξαρση, περίπου 100 άτομα νόσησαν από διαρροϊκή δηλητηρίαση των δίθυρων μετά από κατανάλωση μυδιών που είχαν αλιευθεί από τη δυτική ακτή της Σουηδίας (Krogh και συν., 1985). Το 1987 η Νορβηγία θέσπισε πρόγραμμα επιτήρησης των μυδιών για την παρουσία τοξινών της διαρροϊκής δηλητηρίασης από κατανάλωση δίθυρων.

Στη Γερμανία αναφέρονται σποραδικά κρούσματα στην περιοχή Husum. Παρότι οι DSP τοξίνες ανιχνεύονται επί σειρά χρόνων στο Γερμανικό Κόλπο, τα κρούσματα που αναφέρονται είναι σποραδικά (Gestal – Otero, 2000).

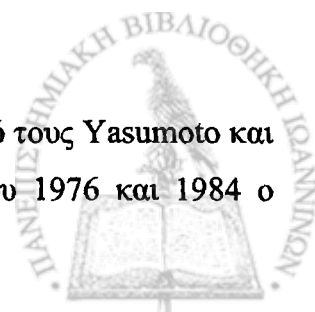
Στην Ισπανία τα πρώτα κρούσματα αναφέρονται το 1978 στην εκβολή του ποταμού Ares. Το 1986 αναφέρεται επιδημική έξαρση με 5000 περιστατικά. Έκτοτε οι διαρροϊκές τοξίνες ανιχνεύονται τακτικά στα θαλάσσια ύδατα της Ισπανίας. Στην Πορτογαλία από το 1987, κάθε χρόνο ανιχνεύονται DSP τοξίνες σε μύδια στις θαλάσσιες ακτές της βόρειας Πορτογαλίας (Gestal – Otero, 2000).

Στην Ιταλία τα πρώτα περιστατικά διαρροϊκής δηλητηρίασης από δίθυρα παρουσιάστηκαν το 1989 και προκλήθηκαν από κατανάλωση μυδιών από τις ακτές της βόρειας και βορειοδυτικής Αδριατικής (Draisci και συν., 1995).

Στην Ελλάδα η πρώτη επιδημική έκρηξη διαρροϊκής δηλητηρίασης από κατανάλωση δίθυρων εμφανίστηκε στη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής στην πόλη της Θεσσαλονίκης (Ιανουάριος 2000) και περιγράφεται διεξοδικά στο Ειδικό μέρος. Ο έλεγχος των θαλάσσιων υδάτων στον Θερμαϊκό κόλπο στην διάρκεια της επιδημίας αυτής, έδειξε αυξημένο αριθμό τοξικών δινομαστιγωτών *Dinophysis acuminata* και *Dinophysis sacculus* (Koukaras και Nikolaidis, 2002).

A.2.2.3. Ασία

Η πρώτη αναφορά σε διαρροϊκή δηλητηρίαση από δίθυρα έγινε από τους Yasumoto και συν. (1978) το 1976 και 1977 στη βορειοδυτική Ιαπωνία. Μεταξύ του 1976 και 1984 ο



Kawabata (1989) αναφέρει 34 επιδημικές εξάρσεις κατά τις οποίες προσβλήθηκαν 1257 άτομα. Στην ανατολική ακτή της Ρωσίας αναφέρεται κόκκινη παλίρροια λόγω δινομαστιγωτών *Dinophysis* spp. (*D. acuminata*, *D. acuta*, *D. fortii* και *D. norvegica*) και παρουσία DSP τοξινών (Κοποναλονα, 1991). Τέλος η παρουσία DSP τοξινών έχει επιβεβαιωθεί στις ακτές της Ινδίας, αν και δεν έχουν αναφερθεί κρούσματα διαρροϊκής δηλητηρίασης από δίθυρα σε ανθρώπους (Karunasagar και συν., 1989).

A.2.2.4. Αμερική

Το πρώτο επιβεβαιωμένο περιστατικό διαρροϊκής δηλητηρίασης από δίθυρα στην Αμερική παρουσιάστηκε στην ανατολική ακτή της Νέας Σκωτίας στον Καναδά το 1990 (Gestal – Otero, 2000) και οφειλόταν σε κατανάλωση μυδιών που περιείχαν DST – 1. Το 1989 ανιχνεύτηκε μεγάλος αριθμός *Dinophysis acuminata* στην περιοχή του Long Island της Νέας Υόρκης. Παρόλα ταύτα οι συγκεντρώσεις δινοφυσιτοξινών στα μύδια ήταν μικρές (0,5 MU) και δεν αναφέρθηκαν ανθρώπινα κρούσματα.

A.2.3. Κλινική εικόνα – Θεραπεία

Τα συμπτώματα εμφανίζονται από 30 min έως και μερικές ώρες (έως 12 h) μετά την κατανάλωση των τοξικών μυδιών και περιλαμβάνουν διάρροια (92%), ναυτία (80%), έμετο (79%) και κοιλιακό άλγος (53%). Στις περισσότερες περιπτώσεις η συχνότητα των εμέτων και των διαρροϊκών κενώσεων ανέρχεται σε 4 την ημέρα, αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις που έφταναν έως και 20 / ημέρα. Η αποδρομή των συμπτωμάτων συνήθως επέρχεται μετά από τρεις ημέρες. Η εμφάνιση της διάρροιας στον άνθρωπο προκαλείται μετά από πρόσληψη per os 40 mg οκαδαϊκού οξέος και 36 mg DTX – 1 αντίστοιχα. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η νόσος δεν προκαλεί θάνατο (Yasumoto και συν., 1978· James και συν., 2000).

Δεν υπάρχει αντίδοτο για τις DSP τοξίνες και η αντιμετώπιση γίνεται με συντηρητική θεραπεία για την ανακούφιση των συμπτωμάτων.



A.2.4. Πρόληψη – μέτρα προφύλαξης

Η πρόληψη της μόλυνσης των μυδιών με τοξίνες του διαρροϊκού συνδρόμου είναι εξαιρετικά δύσκολη, λόγω των πολλών παραγόντων που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των τοξικών δινοφυστιγοτών, καθώς και τη συσσώρευση τοξινών στα μύδια. Για αυτόν το λόγο σε αρκετές χώρες έχει θεσπιστεί δίκτυο επιτήρησης των ιχθυοκαλλιεργειών. Η Ευρωπαϊκή Ένωση στο άρθρο 2 της κοινοτικής απόφασης 2002/25/EK αναφέρει ότι: «Το ανώτατο όριο οκαδαϊκού οξέος, δινοφυσιτοξινών και πεκτενοτοξινών συνολικά στα ζώα που αναφέρονται στο άρθρο 1 (ολόκληρο σώμα ή οποιοδήποτε μέρος που μπορεί να καταναλωθεί χωριστά) ορίζεται σε 160 μικρογραμμάρια ισοδυνάμου οκαδαϊκού οξέος ανά χιλιόγραμμο».

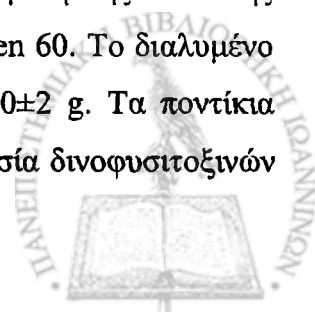
A.2.5. Ανίχνευση DSP τοξινών

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί κατά καιρούς διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση του οκαδαϊκού οξέος και των δινοφυσιτοξινών. Η επίσημη μέθοδος της Ευρωπαϊκής Ένωσης περιγράφεται στο Παράρτημα της Κοινοτικής Απόφασης 2002/25/EK, όπου για τον έλεγχο των μυδιών απαιτείται η διενέργεια βιολογικής δοκιμασίας με χρήση ποντικών (Mouse Bioassay). Τα αποτελέσματα της βιολογικής δοκιμασίας είναι δυνατόν να συμπληρώνονται από έλεγχο των μυδιών με μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με φθορισμομετρική ανίχνευση, με ή χωρίς τη χρήση φασματογράφου μάζας.

A.2.5.1. Βιολογικές μέθοδοι

Με χρήση ποντικών

Η βιολογική μέθοδος για ανίχνευση δινοφυσιτοξινών χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Yasumoto και συν. (1978) για τη διερεύνηση σειράς επιδημικών εξάρσεων στην Ιαπωνία τα έτη 1976 και 1977. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει εκχύλιση των τοξινών από τη σάρκα των μυδιών με ακετόνη. Μετά από εξάτμιση της ακετόνης λαμβάνεται το υπόλειμμα και διαλύεται σε μικρό όγκο διαλύματος Tween 60. Το διαλυμένο αυτό υπόλειμμα ενίεται ενδοπεριτοναϊκά σε ποντίκια μέσου βάρους 20 ± 2 g. Τα ποντίκια ελέγχονται για περίοδο 24 ωρών. Το δείγμα θεωρείται θετικό για παρουσία δινοφυσιτοξινών



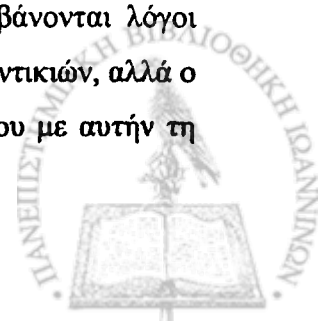
εάν δύο από τα τρία ποντίκια της ομάδας των πειραματόζωων πεθάνουν εντός εικοσιτετραώρου, εμφανίζοντας τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της τοξίκωσης από δινοφουσιτοξίνες. Συγκεκριμένα οι δινοφουσιτοξίνες προκαλούν στα ποντίκια αρχικά απάθεια, γενικευμένη αδυναμία, δυσκινησία, σπασμούς, σκούρο χρωματισμό του δέρματος, κοπιώδη αναπνοή και τελικά θάνατο. Ως μονάδα μέτρησης της συγκέντρωσης των δινοφουσιτοξινών χρησιμοποιείται το mouse unit (MU) που αντιπροσωπεύει ποσότητα ικανή να προκαλέσει το θάνατο σε ποντίκια εντός 48 ωρών. Οι περισσότερες χώρες έχουν θέσει ως κατώτερο όριο τα 0,05 MU/g σάρκας μυδιών (Sullivan, 1993; James και συν., 2000).

Μια τροποποίηση της μεθόδου περιλαμβάνει εκχύλιση με αιθέρα εις τριπλούν στην προσπάθεια να ξεπερασθεί το πρόβλημα της κακής διαλυτότητας του εκχυλίσματος ακετόνης σε υδατικό διάλυμα Tween 60. Το εκχύλισμα ακετόνης εκπλένεται εις διπλούν με μικρή ποσότητα νερού, έτσι ώστε να εκπλυθούν τυχόν υπάρχουσες τοξίνες του παραλυτικού συνδρόμου των δίθυρων και ελεύθερα λιπαρά οξέα που είναι ιδιαίτερα τοξικά για τα ποντίκια και πιθανώς να δώσουν ψευδή θετικά αποτελέσματα (James και συν., 2000). Με βάση αυτή την τροποποίηση έχει μεταβληθεί ο ορισμός του MU. Έτσι ως mouse unit θεωρείται η συγκέντρωση τοξίνης που προκαλεί θάνατο στα δύο από τα τρία ποντίκια της πειραματικής ομάδας εντός 24 ωρών.

Η μέθοδος αυτή αποτελεί την μέθοδο εκλογής για την ανίχνευση των δινοφουσιτοξινών. Το βασικό της πλεονέκτημα και μειονέκτημα ταυτόχρονα, είναι ότι ουσιαστικά ανιχνεύει οποιαδήποτε λιπόφιλη τοξική ένωση που περιέχεται στη σάρκα των εξεταζόμενων μυδιών, οπότε ανιχνεύεται η παρουσία ακόμα και άγνωστων τοξικών ενώσεων που υπάρχουν στα μύδια. Η έλλειψη ειδικότητας της μεθόδου, η υποκειμενικότητα στην εκτίμηση των συμπτωμάτων και του χρόνου θανάτου από τον εξεταστή, οι ατομικές διαφορές στην ευαισθησία που είναι δυνατόν να υπάρχουν μεταξύ των πειραματόζωων έναντι των δινοφουσιτοξινών και φυσικά η αναγκαιότητα χρήσης πειραματόζωων αποτελούν τα σημαντικότερα μειονεκτήματα αυτής.

Με χρήση θηλαζόντων ποντικών

Σε αυτή την μέθοδο χορηγείται 0,1 ml εκχυλίσματος σάρκας μυδιών ενδογαστρικά σε ποντίκια 4 – 5 ημερών. Μετά από 4 ώρες μετράται ο όγκος υγρού που περιέχεται στο γαστρεντερικό σωλήνα, με τον υπολογισμό του λόγου του όγκου του εντέρου έναντι του συνολικού όγκου του σώματος του ποντικού. Ως θετικό αποτέλεσμα λαμβάνονται λόγοι ανώτεροι του 0,8 – 0,9. Η μέθοδος είναι ταχύτερη από αυτήν των ενηλίκων ποντικών, αλλά ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των τοξινών είναι αρκετά κοπιώδης. Εξάλλου με αυτήν τη



μέθοδο ανιχνεύονται μόνο τοξίνες που προκαλούν διάρροια στα ποντίκια (Sullivan, 1993· James και συν., 2000).

Με χρήση αρουραίων

Σε νηστικούς αρουραίους χορηγείται μείγμα ζωοτροφής που περιέχει σε συγκεκριμένη αναλογία σάρκα των μυδιών που εξετάζονται. Οι αρουραίοι επιτηρούνται για 16 ώρες και εξετάζεται η εμφάνιση διάρροιας, η συνεκτικότητα των κοπράνων και η άρνηση λήψης τροφής. Η μέθοδος είναι στην καλύτερη των περιπτώσεων ημιποσοτική και δεν ανιχνεύει τις πεκτενοτοξίνες και τις γεσσοτοξίνες.

Με την μέθοδο του Ειλεακού κρημνού

Με αυτή τη μέθοδο ενίεται σε αποκλεισμένο ειλεό αναισθητοποιημένου αρουραίου ομογενοποιημένη σάρκα μυδιών σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά από δύο ώρες ο ειλεός αποχωρίζεται και μετράται το μήκος (L_a) και το βάρος (a) του. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται άλλο τμήμα του λεπτού εντέρου, όπου μετράται το μήκος (L_b) και το βάρος (b) του. Η απέκκριση υπολογίζεται με βάση τη διαφορά των λόγων $(L_a/a) - (L_b/b)$ (mg/cm). Το όριο ανίχνευσης αναφέρεται ότι είναι τα 0,05 mg οκαδαϊκού οξέος ανά 100 g σάρκας δίθυρων. Η γραμμικότητα της μεθόδου είναι αρκετά καλή στο εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ 0,5 και 5 mg/100 g. Η μέθοδος είναι ευαίσθητη και ποσοτική. Ανιχνεύονται όμως μόνο οι τοξίνες που προκαλούν διάρροια στα ποντίκια (James και συν., 2000).

A.2.5.2. Ανοσοενζυμικές μέθοδοι

Οι Hokama και Smith (1990) ανέπτυξαν ένα μονοκλωνικό αντίσωμα για την ανίχνευση της σιγκουατοξίνης και συγγενών πολυαιθέρων, το οποίο ελέγχθηκε έναντι της σιγκουατοξίνης, του οκαδαϊκού οξέος και ενός τμήματος του μορίου του τελευταίου. Η εμπορική εφαρμογή του μονοκλωνικού αντισώματος κατασκευάστηκε σε stick με την ονομασία Ciguatex test kit. Το όριο ανίχνευσης του οκαδαϊκού οξέος ήταν 1 ng, ενώ σε σάρκα ψαριού ήταν 50 pg/g.

Οι Usagawa και συν. (James και συν., 2000) ανέπτυξαν τρία μονοκλωνικά αντισώματα από κλώνους υβριδώματος έναντι του οκαδαϊκού οξέος. Αυτά τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν στη δημιουργία ανοσοενζυμικής μεθόδου ανταγωνισμού (competitive ELISA) με την εμπορική ονομασία DSP – Check. Σε αυτή σύμπλοκο οκαδαϊκού οξέος και αλβουμίνης βόειου πλάσματος επικαλύπτει τα βοθρία. Η μέθοδος είναι ποσοτική και το όριο

ανίχνευσης για το οκαδαϊκό οξύ είναι 10 ng/ml. Τα αντισώματα δίνουν διασταυρούμενη αντίδραση με τη DTX – 1 κατά 70% και τη DTX – 2 κατά 40%, αλλά δεν αντιδρούν με τη DTX – 3, τις πεκτενοτοξίνες και τις γεσσοτοξίνες. Λόγω της χρήσης οκαδαϊκού οξέος η συγκεκριμένη μέθοδος είναι μάλλον ακριβή.

Οι Shestowsky και συν. (1992) ανέπτυξαν δύο μονοκλωνικά αντισώματα. Το πρώτο είναι αντίσωμα έναντι του οκαδαϊκού οξέος (ονομάστηκε 6/50) και το δεύτερο είναι ένα αντίσωμα έναντι του αντισώματος του οκαδαϊκού οξέος (ονομάστηκε 1/59). Έτσι, στην κάλυψη των βοθρίων της ELISA χρησιμοποίησαν αντί του οκαδαϊκού οξέος το αντίσωμα 1/59. Η μέθοδος ανιχνεύει συγκεντρώσεις οκαδαϊκού οξέος μεταξύ 9 και 81 ng/ml. Η εταιρεία Rougier Biopharm εφάρμοσε αυτή τη μέθοδο σε εμπορικό πακέτο (kit). Λόγω της χαμηλής συγγένειας των DTX – 1 και DTX – 2 ουσιαστικά αυτή η μέθοδος δεν ανιχνεύει τις αναφερθείσες τοξίνες, καθώς και τις DTX – 3 και την μπρεβετοξίνη – 1.

A.2.5.3. Μέθοδοι κυτταροτοξικότητας

Κατά καιρούς στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διάφορες μέθοδοι που στηρίζονται στην πρόκληση βλαβών σε κυτταρικές σειρές από διαρροϊκές τοξίνες των μυδιών. Οι Tachibana και συν. (1981) αναφέρουν μέθοδο που στηρίζεται στην κυτταροτοξική δράση των τοξινών σε ηπατοκύτταρα αρουραίων. Η μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύσει και τις τρεις κατηγορίες τοξινών (δινοφουσιτοξίνες, πεκτενοτοξίνες και γεσσοτοξίνες). Παρόλα ταύτα είναι χρονοβόρα και η ανίχνευση είναι δύσκολη σε περίπτωση συνύπαρξης περισσότερων της μιας κατηγοριών τοξινών.

Οι Amzil και συν. (James και συν., 2000) ανέπτυξαν μια ταχεία μέθοδο κυτταροτοξικότητας για την ανίχνευση του οκαδαϊκού οξέος και των δινοφουσιτοξινών. Η μέθοδος προσδιορίζει την ελάχιστη ενεργό συγκέντρωση εκχυλισμάτων μυδιών που προξενεί μορφολογικές αλλοιώσεις σε ανθρώπινα κύτταρα KB. Η μέθοδος βασίζεται στη μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων. Τα αποτελέσματα της μεθόδου ήταν συγκρίσιμα με αυτά της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας και το όριο ανίχνευσης οκαδαϊκού οξέος ήταν 0,125 μg.

Εκτός αυτών αναπτύχθηκε και μια φωτομετρική (colorimetric) μέθοδος για την ανίχνευση της κυτταροτοξικής δράσης του οκαδαϊκού οξέος σε κύτταρα KB. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των μεταβολικά ενεργών κυττάρων να καταβολίσουν ένωση τετραζολίου, δράση η οποία αναστέλλεται από το οκαδαϊκό οξύ (Tubaro και συν., 1996' Pouchus και συν., 1997).



A.2.5.4. Χημικές μέθοδοι

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η πρώτη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για την ανίχνευση του οκαδαϊκού οξέος και των δινοφουσιτοξινών αναφέρεται από τους Lee και συν. (1987) και Sullivan (1988). Το ήπατοπάγκρεας των δίθυρων ομογενοποιείται με μεθανόλη 80% και εκπλένεται με πετρελαϊκό αιθέρα. Η τελική εκχύλιση γίνεται με χλωροφόρμιο. Μέρος του εκχυλίσματος ξηραίνεται σε ρεύμα αζώτου και η παραγωγή γίνεται με διάλυμα 0,1% 9 – ανθρυλδιαζομεθάνιου (9 – anthryldiazomethane, ADAM). Τέλος γίνεται καθαρισμός με στήλη εκχύλισης σταθερής φάσης. Χρησιμοποιείται στήλη ODS και η υγρή φάση αποτελείται από ακετονιτρίλιο, χλωροφόρμιο και νερό σε αναλογία 8:1:1. Η ανίχνευση γίνεται με φθορισμομετρικό ανιχνευτή με μήκος κύματος διέγερσης τα 365 nm και μήκος κύματος εκπομπής τα 412 nm.

Έκτοτε έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες βελτίωσης αυτής της μεθόδου. Το αντιδραστήριο ADAM, παρότι έχει μεγάλη ευαισθησία στην παραγωγή, είναι εξαιρετικά ασταθές με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος μερικής παραγωγής του δείγματος και εμφάνισης κορυφών παράγωγων ενώσεων στο χρωματογράφημα (James και συν., 2000). Διάφορες τροποποιήσεις έχουν προταθεί για την καλύτερη παραγωγή του δείγματος και για την επίτευξη βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών (Aase και Rogstad, 1997).



Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



B.1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της παραγωγής ορισμένων βιοτοξινών σε θαλασσινά τρόφιμα. Συγκεκριμένα να μελετηθεί: α) η παραγωγή ισταμίνης σε δείγματα τόννου, υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασιακής (κακο-) μεταχείρισης, β) η ικανότητα παραγωγής ισταμίνης από τα βακτηριακά στελέχη, που απομονώθηκαν από τα παραπάνω δείγματα τόννου, γ) η συμβολή του κάθε βακτηριακού στελέχους στη συγκέντρωση ισταμίνης στον μυϊκό ιστό του ψαριού, δ) η ικανότητα ανίχνευσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων έξι διαφορετικών εκλεκτικών υποστρωμάτων, ενώ παράλληλα έγινε προσπάθεια δημιουργίας νέων εκλεκτικών υποστρωμάτων τροποποιώντας τη σύνθεση των υπαρχόντων υποστρωμάτων και τέλος ε) διερευνήθηκε εργαστηριακά το αίτιο της επιδημικής έξαρσης τροφιμογενούς δηλητηρίασης εξαιτίας κατανάλωσης τοξικών μυδιών, η οποία εκδηλώθηκε στην περιοχή της Θεσσαλονίκης στην διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.



B.2. Υλικά και Μέθοδοι

B.2.1. Μελέτη παραγωγής ισταμίνης σε δείγματα τόννου υπό διάφορες συνθήκες θερμικής μεταχείρισης

B.2.1.1. Δείγματα

Χρησιμοποιήθηκαν επτά φιλέτα τόννου και 28 τόννοι. Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν στην Μεγάλη Βρετανία από υπαλλήλους του αεροδρομίου Heathrow και εστάλησαν στο Central Public Health Laboratory Service (CPHLS) για μικροβιολογικό έλεγχο.

Τα φιλέτα τόννου προέρχονταν από τη Σρι Λάνκα, ενώ από τους 28 ολόκληρους τόννους που χρησιμοποιήθηκαν, οι έξι είχαν εισαχθεί από τη Βραζιλία, οι επτά από τη Σρι Λάνκα, οι πέντε από τις Μαλδίβες, οι 11 από την Ινδονησία και οι τρεις από την Υεμένη. Η μεταφορά των δειγμάτων έγινε μέσα σε πάγο. Μετά την άφιξη στο εργαστήριο τα φιλέτα τόννου αποθηκεύτηκαν στους 3 – 4°C και υποβλήθηκαν σε περαιτέρω επεξεργασία σε διάστημα 1 – 2 ημερών μετά την άφιξη. Όλα τα δείγματα ολόκληρου τόννου απολεπίστηκαν, απεντερώθηκαν, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες σακούλες (PVC) και χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, εκάστη των οποίων συντηρήθηκε σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας.

B.2.1.2. Δειγματοληψία

Για την μικροβιολογική εξέταση και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ισταμίνης η δειγματοληψία έγινε από την επιφάνεια του μέσου τμήματος του ολόκληρου τόννου ή του κέντρου του φιλέτου τόννου και σε βάθος ~1 cm, με άσηπτη αφαίρεση κάθετης λωρίδας μυϊκής μάζας, βάρους ≥ 30 g. Η ομογενοποίηση του κάθε δείγματος έγινε σε εργαστηριακό ομογενοποιητή (Atomix, MSE, Palisades Park, NJ, USA). Για τον μικροβιολογικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν 10 g και για τον προσδιορισμό της ισταμίνης χρησιμοποιήθηκαν 20 g από τα οποία 10 g εξετάστηκαν με τη φθορισμομετρική μέθοδο και 10 g με την ανοσοενζυμική μέθοδο. Σε όλα τα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση ισταμίνης κατά την παραλαβή.

B.2.1.3. Πείραμα θερμικής κακομεταχείρισης

Το πρωτόκολλο χειρισμών των τόννων καθώς και το ιστορικό των θερμοκρασιών έκθεσης περιγράφεται συνοπτικά στον Πίνακα 14.



α. Πείραμα με φιλέτα τόννου. Τα φιλέτα τόννου χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες αποτελούμενες από δύο φιλέτα η κάθε μια.

Οι δύο πρώτες ομάδες φιλέτων αποθηκεύτηκαν στους $0 - 2^{\circ}\text{C}$ και υποβλήθηκαν για 11 συνεχόμενες ημέρες σε καθημερινή έκθεση στους 25°C για μία και τρεις ώρες αντίστοιχα.

Οι υπόλοιπες δύο ομάδες αποθηκεύτηκαν στους $5 - 7^{\circ}\text{C}$ και υποβλήθηκαν επίσης για 11 ημέρες σε καθημερινή έκθεση στους 25°C για 1 και 3 ώρες αντίστοιχα.

Όλα τα φιλέτα τόννου εξετάστηκαν για το σχηματισμό ισταμίνης πριν από τη θερμική κακομεταχείριση (ημέρα 0), καθώς και την πέμπτη και ενδέκατη ημέρα.

β. Πείραμα με ολόκληρους τόννους. Οι ολόκληροι τόννοι διαιρέθηκαν σε τρεις ομάδες:

Η πρώτη ομάδα: αποτελούνταν από 12 καταψυγμένους τόννους, που συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία $3 - 4^{\circ}\text{C}$.

Η ομάδα αυτή χωρίστηκε σε τέσσερις υποομάδες: τρεις για την πειραματική κακομεταχείριση και μία μάρτυρες. Η κάθε υποομάδα αποτελούνταν από τρεις τόννους.

Η υποομάδα των μαρτύρων αποψύχθηκε στους $3 - 4^{\circ}\text{C}$ και συντηρήθηκε στους $3 - 4^{\circ}\text{C}$ καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

Οι άλλες τρεις υποομάδες αποψύχθηκαν χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές μεθόδους:

1) απόψυξη στους $3 - 4^{\circ}\text{C}$.

2) απόψυξη σε θερμοκρασία 20°C .

3) απόψυξη σε φούρνο μικροκυμάτων (Cooktronic M710, Philips) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι τρεις αυτές υποομάδες εκτίθεντο επί επτά ημέρες για 2 ώρες καθημερινά σε θερμοκρασία 20°C . Δειγματοληψίες για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης έγιναν την ημέρα 0, καθώς και την πέμπτη και έβδομη ημέρα της θερμικής κακομεταχείρισης.

Η δεύτερη ομάδα: αποτελούνταν από 9 τόννους, τρεις νωπούς, τρεις καταψυγμένους και τρεις μάρτυρες (νωποί τόννοι) και συντηρήθηκαν σε $0 - 2^{\circ}\text{C}$.

[Η θερμοκρασία αυτή επιτεύχθηκε με την τοποθέτηση των τόννων μέσα σε επαρκή ποσότητα πάγου και διατήρησή τους μέσα σε δωμάτιο - ψυγείο με θερμοκρασία 4°C].

Οι μάρτυρες συντηρήθηκαν στους $0 - 2^{\circ}\text{C}$ καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

Οι τρεις νωποί τόννοι εκτίθεντο σε θερμοκρασία 30°C (σε δωμάτιο - επωαστήρα) για 2 ώρες επί 12 ημέρες καθημερινά.



Οι τρεις καταψυγμένοι τόννοι, αφού αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία ψυγείου (4 – 5°C), υπέστησαν την ίδια θερμική κακομεταχείριση.

Σε όλα τα δείγματα τόννων μετρήθηκε η συγκέντρωση ισταμίνης πριν τη θερμική κακομεταχείριση, την τέταρτη, την όγδοη και τη δωδέκατη ημέρα της θερμικής κακομεταχείρισης.

Πίνακας 14. Πρωτόκολλο χειρισμών τόννων

	Χαρακτηριστικά Ομάδας	Αριθμός δειγμάτων ανά ομάδα	Θερμοκρασία συντήρησης	Χρόνος συντήρησης (ημέρες)	Θερμοκρασία έκθεσης	Διάρκεια έκθεσης (h)	Ημέρα δειγματοληψίας
Φιλέτα τόννου	Νωπά φιλέτα	2	0 – 2°C	11	25°C	1	0, 5 ^η , 11 ^η
		2	5- 7°C			1	
		2	0 – 2°C			3	
		2	5- 7°C			3	
Ολόκληροι τόννοι καταψυγμένοι	Μάρτυρες	3	3 – 4°C	7	20°C	2	0, 5 ^η , 7 ^η
	Απόψυξη (20°C)	3					
	Απόψυξη (3–4°C)	3					
	Απόψυξη σε φούρνο μικροκυμάτων	3					
Ολόκληροι τόννοι	Μάρτυρες	3	0 – 2°C	12	30°C	2	0, 8 ^η , 12 ^η
	Νωποί	3					
	Κατεψυγμένοι	3					
Ολόκληροι τόννοι	Μάρτυρες	3	6 – 7°C	12	30°C	2	0, 8 ^η , 12 ^η
	Νωποί	3					
	Κατεψυγμένοι	3					



Η τρίτη ομάδα: περιελάμβανε εννέα τόννους (έξι νωπούς, τρεις κατεψυγμένους), οι οποίοι συντηρήθηκαν στους $6 - 7^{\circ}\text{C}$, χρησιμοποιώντας έναν ψυχόμενο επωαστήρα (LMS cooled incubator, model No 303, LMS, Kent, United Kingdom).

Οι τρεις νωποί τόννοι χρησίμευσαν ως μάρτυρες και συντηρήθηκαν στους $6 - 7^{\circ}\text{C}$ καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

Οι υπόλοιποι τρεις νωποί τόννοι εκτίθεντο επί 12 ημέρες καθημερινά σε θερμοκρασία 30°C σε δωμάτιο - επωαστήρα για 2 ώρες.

Οι τρεις κατεψυγμένοι τόννοι αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία ψυγείου ($4 - 5^{\circ}\text{C}$) και υπέστησαν την ίδια θερμική κακομεταχείριση.

Σε όλους τους τόννους μετρήθηκε η συγκέντρωση ισταμίνης πριν τη θερμική κακομεταχείριση και την 4^η, 8^η και 12^η ημέρα θερμικής κακομεταχείρισης.

B.2.1.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ισταμίνης στα δείγματα τόννου

Ο προσδιορισμός της ισταμίνης στα δείγματα τόννου έγινε με δύο μεθόδους, την φθορισμομετρική και την ανοσοενζυμική.

Φθορισμομετρική μέθοδος: εφαρμόστηκε η μέθοδος των Taylor και συν. (1978a) ως ακολούθως:

10 g σάρκας ψαριού αναμιγνύονταν με 50 ml μεθανόλης και ομογενοποιούνταν σε ομογενοποιητή Atomix (MSE Atomix, Palisades Park, NJ, USA). Το ομογενοποίημα τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο στους 60°C για 15 min. Μετά από ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, ο όγκος ρυθμίζονταν στα 100 ml με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μεθανόλης. Το ομογενοποίημα φιλτραριζονταν με διηθητικό χαρτί Whatman No 1. Σε κατάλληλη αραιώση του δείγματος προσθέτονταν 1 ml διαλύματος 5M NaOH, επαρκής ποσότητα Na_2CO_3 έως κορεσμού του τελικού διαλύματος, και 6 ml κορεσμένης με νερό βουτανόλης. Μετά από έντονη ανακίνηση λαμβάνονταν η οργανική φάση και σε 3 ml αυτής προσθέτονταν 3 ml διαλύματος 0,1M HCl. Ακολουθούσε έντονη ανακίνηση και λήψη της υδατικής φάσης. Δύο ml της υδατικής φάσης τοποθετούνταν σε κυψελίδα με 0,4 ml διαλύματος 1M HCl και 0,1 ml διαλύματος 1% ο - φθαλδιαλδεϋδης. Μετά από ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 min η αντίδραση διακόπτονταν με προσθήκη 0,2 ml διαλύματος 2M HCl.

Η ανίχνευση φθορισμού γινόταν στα 360 nm (εκκομπή στα 450 nm) με τη χρήση ενός φθορισμόμετρου Kontron M25 (Kontron Analytical, Kontron Instruments Ltd, Herts, UK). Η ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος γινόταν μετά από σχεδιασμό πρότυπης καμπύλης. Η



πρότυπη καμπύλη σχεδιαζόταν με τη βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων ισταμίνης σε μεθανόλη (L – histamine dihydrochloride, 99% TLC powder, H7250, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) γνωστής συγκέντρωσης (0, 20, 40, 60, 80 και 100 mg/ml). Στην περίπτωση που τα δείγματα υπερέβαιναν τη συγκέντρωση ισταμίνης των 100 mg/ml, εκτελούνταν κατάλληλη αραίωση του εκχυλίσματος μεθανόλης του δείγματος σε μεθανόλη.

Κάθε φορά που εφαρμοζόταν η φθορισμομετρική μέθοδος ελεγχόταν δύο πρότυπα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης, έτσι ώστε να υπάρχει έλεγχος της ορθότητας των μετρήσεων. Στην περίπτωση που τα αποτελέσματα των μετρήσεων ήταν κατά δύο τυπικές διακυμάνσεις διαφορετικά από τις γνωστές συγκεντρώσεις ισταμίνης των προτύπων, τότε η μέτρηση επαναλαμβανόταν. Οι μετρήσεις της συγκέντρωσης ισταμίνης με τη φθορισμομετρική μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της ανοσοενζυμικής μεθόδου.

Ανοσοενζυμική μέθοδος: Τα ίδια δείγματα τόννου εξετάστηκαν και με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA Histamine Veratox (Adgen Ltd, Cunningham Building, Scotland, UK).

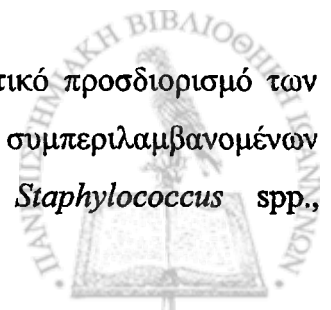
Για την εκτέλεση της ανοσοενζυμικής μεθόδου ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Η εκχύλιση περιελάμβανε εκχύλιση 10 g δείγματος με 90 ml αποσταγμένου νερού και έντονη ανακίνηση για 15 – 20 sec εις τριπλούν. Το εκχύλισμα διηθούνταν μέσω διηθητικού χαρτιού Whatman No 1. Εκατό μl του διηθήματος τοποθετούνταν στο ανάλογο βοθρίο της πλάκας ELISA. Το εύρος ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου κυμαίνεται μεταξύ 2,5 και 50 ppm. Στην περίπτωση που τα δείγματα υπερέβαιναν αυτή τη συγκέντρωση εκτελούνταν οι κατάλληλες αραιώσεις σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

B.2.1.5. Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η two-sided student t – test.

B.2.1.6. Μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων τόννου

Ο μικροβιολογικός έλεγχος αφορούσε τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των συχνότερα εξεταζόμενων μικροβιολογικών δεικτών των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων και των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων (*Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp.,



Pseudomonas spp., *Vibrio* spp., *Photobacterium* spp., Θειοαναγωγικά και Οξυγαλακτικά βακτήρια).

Οι μικροβιολογικές παράμετροι που εξετάστηκαν και τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Παράμετροι μικροβιολογικής εξέτασης θερμικά κακομεταχειρισμένων τόννων

	Θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε	Πρόσθετες ουσίες	Θερμοκρασία επώασης	Χρόνος επώασης (ημέρες)
Ολική Μεσοφιλή Χλωρίδα (OMX)	Plate Count Agar		30°C	2
Enterobacteriaceae (L+, L-)	MacConkey Agar No.3		37°C	1
Οξυγαλακτικά βακτήρια	DeMan – Rogosa – Sharpe Agar		37°C	3
Θειοαναγωγικά βακτήρια	Tryptose Sulfite Cycloserine Agar	D-cycloserine 400 mg/l	37°C	2
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> Agar	Cetrimide (10 ml/L), Fucidin (10 mg/L), Cephaloridine (50 mg/L)	30°C	2
<i>Vibrio</i> spp.	Thiosulphate Citrate Bile Sucrose Agar		37°C	1

Ποσοτικός μικροβιολογικός έλεγχος

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιολογικών δεικτών έγινε με την μέθοδο της καταμέτρησης μετά από επιφανειακή εξάπλωση σε άγαρ (Surface Plate Count) και με την μέθοδο της καταμέτρησης μετά από ενσωμάτωση σε άγαρ (Plate Count). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τους Roberts και συν. (1995).

10 g ομογενοποιημένου μυϊκού ιστού τόννων αραιώθηκαν σε 90 ml Maximum Recovery Diluent (MRD) και έγιναν υποδεκαπλάσιες αραιώσεις. Για την μέθοδο της επιφανειακής καταμέτρησης, χρησιμοποιήθηκε όγκος ενοφθαλμίσματος ίσος με 0,1 ml από



κάθε αραίωση, ενώ για την μέθοδο της ενσωμάτωσης σε άγαρ χρησιμοποιήθηκε όγκος ενοφθαλμίσματος ίσος με 1 ml από κάθε αραίωση.

Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα καταμετρήθηκε με επιφανειακή εξάπλωση σε Plate Count Agar (PCA) και επώαση στους 30°C για 48 ώρες.

Τα είδη *Enterobacteriaceae* (λακτόζη θετικά και λακτόζη αρνητικά) καταμετρήθηκαν μετά από επιφανειακή εξάπλωση σε MacConkey agar No.3 και επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Οι αποικίες χαρακτηρίστηκαν ως λακτόζη θετικές ή λακτόζη αρνητικές ανάλογα με το χρώμα της αποικίας.

Τα είδη *Staphylococcus* spp. καταμετρήθηκαν μετά από επιφανειακή εξάπλωση σε Baird – Parker άγαρ με πρόσθετο Egg yolk tellurite emulsion (SR0054, Oxoid Ltd, Hampshire, England) και επώαση στους 37°C για 48 ώρες. Οι χαρακτηριστικές αποικίες εξετάστηκαν για την παραγωγή καταλάσης και πηκτάσης (Staphytect plus, DR0850, Oxoid Ltd, Hampshire, England).

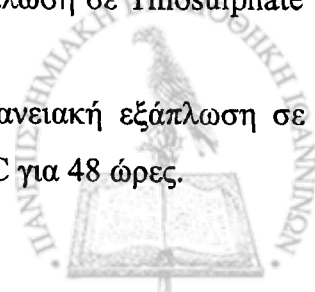
Τα είδη *Pseudomonas* spp. καταμετρήθηκαν μετά από επιφανειακή εξάπλωση σε Pseudomonas agar με πρόσθετα Cetrimide (10 ml/L), Fucidin (10 mg/L) και Cephaloridine (50 mg/L) (C-F-C supplement, SR0103, Oxoid Ltd, Hampshire, England) και επώαση στους 30°C για 48 ώρες. Η επιβεβαίωση των χαρακτηριστικών αποικιών έγινε με τη δοκιμή της οξειδάσης με τη χρήση stick προσδιορισμού οξειδάσης (Oxidase identification sticks, BR0064, Oxoid Ltd, Hampshire, England).

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια καταμετρήθηκαν μετά από ενσωμάτωση σε Tryptose Sulfite Cycloserine άγαρ (TSC) με πρόσθετο *Perfringens* selective supplement (D – cycloserine 400 mg/L; SR088, Oxoid Ltd, Hampshire, England). Η ενσωμάτωση γινόταν με προσθήκη 1 ml ενοφθαλμίσματος σε 15 ml ρευστού θρεπτικού υποστρώματος θερμοκρασίας 50°C. Μετά τη στερεοποίηση του υποστρώματος, προστίθεντο ακόμα 5 ml υποστρώματος ως επικάλυψη. Μετά τη στερεοποίηση του υποστρώματος επώαζονταν σε επωαστικό κλίβανο αναερόβιων (Modular Atmosphere Controlled System, Don Whitley Scientific Ltd, Shipley, West Yorkshire, United Kingdom) στους 37°C για 48 ώρες.

Τα Οξυγαλακτικά βακτήρια καταμετρήθηκαν μετά από επιφανειακή εξάπλωση σε DeMan – Rogosa – Sharpe άγαρ και επώαση σε επωαστικό κλίβανο αναερόβιων στους 37°C για 72 ώρες.

Τα είδη *Vibrio* spp. καταμετρήθηκαν μετά από επιφανειακή εξάπλωση σε Thiosulphate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS) και επώαση στους 37°C για 24 ώρες.

Τα είδη *Photobacterium* spp. καταμετρήθηκαν μετά από επιφανειακή εξάπλωση σε Thiosulphate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS) και επώαση στους 20°C για 48 ώρες.



Απομόνωση και ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

Στη διάρκεια του ποσοτικού μικροβιολογικού ελέγχου όλων των δειγμάτων λαμβάνονταν χαρακτηριστικές αποικίες από τα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η απομόνωση των στελεχών έγινε με ανακαλλιέργεια σε κατάλληλο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Ο έλεγχος καθαρότητας των αποικιών που επρόκειτο να ταυτοποιηθούν έγινε μετά από μικροσκοπική παρατήρηση παρασκευάσματος χρωσμένου με χρώση Gram. Τα στελέχη συντηρήθηκαν στους -80°C με χρήση του καταψύκτη βαθείας κατάψυξης (Forma Scientific Model 723, Forma Scientific Inc.) σε σφαιρίδια του συστήματος Microbank (Pro-Lab Diagnostics, Ritchmond, Canada).

Η ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν βασίστηκε στις βιοχημικές ιδιότητες των βακτηρίων και στις επιβεβαιωτικές δοκιμές. Οι βιοχημικές ιδιότητες ελέγχθηκαν με τη χρήση API (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν των API 20E, API 20 NE και API 20 STAPH.

Οι επιβεβαιωτικές δοκιμές που χρησιμοποιήθηκαν για τα είδη *Staphylococcus* spp. ήταν η δοκιμή της καταλάσης (Perhydrol 30% H_2O_2 , Merck KgaA, Darmstadt, Germany), η δοκιμή της πηκτάσης (Staphydect plus, Oxoid Ltd, Hampshire, England), η παραγωγή DNAασης (DNAase agar, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain) και η ανάπτυξη σε Nutrient agar (Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain) με συγκεντρώσεις NaCl 7,5% και 10%.

Για τα είδη *Pseudomonas* spp. χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή της οξειδάσης (Oxidase identification sticks, Oxoid Ltd, Hampshire, England).

Για τα θειοαναγωγικά βακτήρια χρησιμοποιήθηκε η ανάπτυξη σε Nitrate Motility Agar (Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain).

Για τα είδη *Vibrio* spp. χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή της ανθεκτικότητας σε συγκεντρώσεις 10 ppm και 150 ppm βιμπριοστατικού παράγοντα O129.



B.2.2. Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ισταμίνης, πουτρεσκίνης και καδαβερίνης από βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από δείγματα τόννου

Ο έλεγχος παραγωγής ισταμίνης από τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν έγινε με ενοφθαλισμό των βακτηρίων σε Møller decarboxylase broth που περιείχε συγκέντρωση 1% του ανάλογου αμινοξέος.

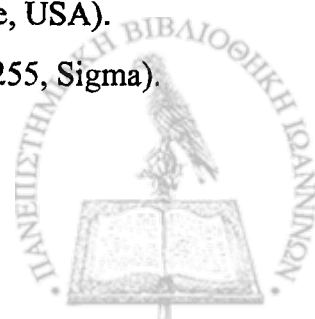
Η ενεργοποίηση των βακτηρίων προς παραγωγή της αντίστοιχης αμίνης έγινε με ενοφθαλισμό αυτών σε Trypticase Soy Broth με προσθήκη 1% του αντίστοιχου αμινοξέος (ιστιδίνη, λυσίνη ή ορνιθίνη). Το pH του υποστρώματος ρυθμίστηκε σε 6,80 (Chen και συν., 1989) πριν την αποστείρωσή του και ελέγχθηκε με χρήση pHμέτρου (El Hama PBS 720, El Hama Instruments, PO Rosh – Pina, Israel). Το υπόστρωμα αποστειρώθηκε στους 121°C για 10 min.

Μετά από εικοσιτετράωρη καλλιέργεια κάθε στελέχους σε TSB + αμινοξύ, ενοφθαλμίστηκε 0,1 ml σε δοκιμαστικό σωλήνα με Møller decarboxylase broth, το οποίο περιείχε το αντίστοιχο αμινοξύ. Στον πρώτο σωλήνα προστέθηκε L – υδροχλωρική ιστιδίνη (L – histidine monohydrochloride monohydrate, >98% TLC, H – 8125, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA), στο δεύτερο L – ορνιθίνη (L – ornithine monohydrochloride, O – 4386, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) και στον τρίτο L – λυσίνη (>98% TLC, L – 5501, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA).

Οι ενοφθαλισμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν για 72 ώρες στους 37°C (Dapkevicus και συν, 2000).

Η σύνθεση του Møller decarboxylase broth που χρησιμοποιήθηκε, περιγράφεται από τον Atlas (1995) και ήταν η εξής:

- Τρυπτόνη 0,5% (EZMix Tryptone, T – 2559, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA).
- Beef extract 0,5% (B – 4888, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA).
- Γλυκόζη 0,05% (α -D-Glucose analytical grade, 17023051, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany).
- Bromocresol purple 0,001% (1.03025, Merck KgaA, Darmstadt, Germany).
- Cresol red 0,0005% (11,447,2, Aldrich Chemical Co, Milwaukee, USA).
- Φωσφορική πυριδοξάλη 0,0005% (pyridoxal 5'-phosphate, P – 9255, Sigma).
- Αμινοξύ (ιστιδίνη, ορνιθίνη ή λυσίνη) σε συγκέντρωση 1%.



Το pH ρυθμίστηκε σε 6,00 με τη βοήθεια pHμέτρου (El Hama PBS 720, El Hama Instruments, PO Rosh – Pina, Israel). Το έτοιμο υπόστρωμα τοποθετήθηκε για 1 ημέρα στους 37°C για δοκιμαστική επώαση.

Κατά τη διάρκεια της επώασης οι θρεπτικοί ζωμοί ελέγχονταν σε καθημερινή βάση για αλλαγή του χρώματος. Θετικό αποτέλεσμα θεωρούνταν η αλλαγή χρώματος σε μοβ, με παράλληλη θόλωση του υποστρώματος.

Στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό των καλλιεργειών φυγοκεντρήθηκε δύο φορές στις 3500 rpm για 10 min σε επιτραπέζια φυγόκεντρο Sorvall GLC-4. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω μικροβιοκρατούς ηθμού και αποθηκεύθηκε μέχρι τη μέτρηση της συγκέντρωσης ισταμίνης σε φιαλίδια σπινθηρισμού αεροστεγώς κλεισμένα σε θερμοκρασία βαθείας κατάψυξης -80°C.

B.2.3. Μελέτη της συμβολής των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από τους τόννους που υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στη συγκέντρωση της ισταμίνης

B.2.3.1. Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης στο υπερκείμενο υγρό των βακτηριακών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το πακέτο έτοιμων αντιδραστηρίων Histamine ELISA της εταιρείας IBL (IBL-Hamburg GmbH, Hamburg, Germany) το οποίο είναι κατάλληλο για κλινικά δείγματα πλάσματος και ούρων και υπερκείμενα υγρά καλλιεργειών κυττάρων. Για την εκτέλεση της μεθόδου ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Για την ανάγνωση της πλάκας ELISA χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο ELISA DAS type A1 (DAS s.r.l., Viali, Roma, Italy).

Πριν την εξέταση των δειγμάτων προηγήθηκε έλεγχος της μεθόδου με χρήση προτύπων διαλυμάτων ισταμίνης σε Møller decarboxylase broth. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις ισταμίνης, 100 ppm, 50 ppm, 20 ppm και 5 ppm, καθώς και αρνητικός μάρτυρας που δεν περιείχε ισταμίνη. Η μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων ισταμίνης έγινε πέντε φορές. Τα αποτελέσματα της ανοσοενζυμικής μεθόδου ήταν συμβατά με τις χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις και θεωρήθηκαν αξιόπιστα και επαρκή για την ανίχνευση ισταμίνης. Συγκεκριμένα ο παράγοντας συσχετισμού r^2 ήταν κατά μέσο όρο 0,982



και η διαφορά των μετρούμενων τιμών δεν ξεπερνούσε την πραγματική συγκέντρωση ισταμίνης κατά περισσότερο από δύο τυπικές αποκλίσεις.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ισταμίνης έγινε στο υπερκείμενο των βακτηριακών καλλιιεργειών σε ζωμό Møller decarboxylase των στελεχών που απομονώθηκαν. Οι απαιτούμενες αραιώσεις έγιναν με διάλυμα 0,1% HCl (Merck) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του πακέτου έτοιμων αντιδραστηρίων ELISA. Βακτήρια που παρήγαγαν συγκεντρώσεις ισταμίνης μεγαλύτερες των 1000 ppm θεωρήθηκαν ως ταχείς παραγωγείς ισταμίνης, ενώ βακτήρια που παρήγαγαν συγκεντρώσεις ισταμίνης έως 400 ppm θεωρήθηκαν ως βραδείς παραγωγείς ισταμίνης. Τα βακτήρια στις καλλιέργειες των οποίων δεν ανιχνεύτηκε συγκέντρωση ισταμίνης μεγαλύτερη από 2 ppm, χαρακτηρίστηκαν ως βακτήρια που δεν παράγουν ισταμίνη.

B.2.3.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης στο υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας έγινε προσπάθεια εφαρμογής μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, περιγράφεται από τους Malle και Valle (1996) για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιογενών αμινών σε ψάρια. Η μέθοδος τροποποιήθηκε κατάλληλα για τον προσδιορισμό ισταμίνης στα υπερκείμενα βακτηριακών καλλιιεργειών.

Το υπερκείμενο βακτηριακής καλλιέργειας φιλτραρίστηκε με χρήση μικροβιοκρατούς ηθμού Acrodisc (Acrodisc syringe filter 0,2 μm, product no. 4192, Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, USA). Σε 1 ml διηθημένου υπερκείμενου βακτηριακής καλλιέργειας προστέθηκαν 2 ml διαλύματος 0,2M κρύου HClO₄ (Perchloric acid 20%, extra pure, AC 1752, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain) και τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων (Branson Ultrasonic bath, B2200-E1, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, USA) για 10 min. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε λουτρό πάγου για 5 min. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση υπό ψύξη στις 3000 rpm για 10 min σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (Uniequip, UEC 14/B, Martinsried, Germany). Σε 100 μl του υπερκείμενου προστέθηκαν 200 μl κορεσμένου υδατικού διαλύματος Na₂CO₃ (Sodium carbonate anhydrous, extra pure, SO 0115, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain) και 400 μl διαλύματος 0,75% dansyl – χλωριδίου (Dansyl chloride, 95% TLC powder, D – 2625, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) σε ακετόνη (Acetone, gradient HPLC grade, AC 0318, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain). Το δείγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 60°C για 1 h χωρίς φως. Στη συνέχεια αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στο δείγμα

προστέθηκαν 100 μl υδατικού διαλύματος 10% προλίνης (L – Proline, extra pure, PR 0055, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain) και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 500 ml τολουόλης (Toluene, gradient HPLC grade, TO 0077, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain) και φυγοκεντρήθηκε υπό ψύξη στις 3000 rpm για 10 min. Λαμβάνονταν η οργανική φάση (υπερκεείμενο) και εξατμιζόταν η τολουόλη σε ρεύμα αζώτου. Τέλος το ξηρό υπόλειμμα διαλύθηκε σε 1 ml ακετονιτρίλιου (Acetonitrile, gradient 240/far UV HPLC grade, AC0318, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain).

Το σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Waters Breeze System (Waters, Massachusetts, USA) και περιελάμβανε τον αυτόματο δειγματολήπτη Waters 717 plus, τις αντλίες Waters 1525 (Waters 1525 binary HPLC pumps) και τον ανιχνευτή UV – Vis Waters 2487 (Waters 2487 dual λ wavelength absorbance detector). Η στήλη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαστάσεων 250 mm x 4,6 mm με υλικό πλήρωσης Nucleosil C18, 5 μm. Η έκλουση ήταν ισοκρατική με διαλύτες ακετονιτρίλιο (Acetonitrile, gradient 240/far UV HPLC grade, AC 0318, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain) και νερό (Water, gradient HPLC grade, AG 0001, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain) σε αναλογία 45:55. Ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε στο 1,5 ml/min. Ο όγκος αγκύλης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 200 μl. Με βάση τη διέλευση πρότυπου διαλύματος ισταμίνης, ο χρόνος κατακράτησης της ισταμίνης ήταν τα 16 min.

Κατά την πιστοποίηση της μεθόδου με χρήση πρότυπων διαλυμάτων ισταμίνης διαφόρων συγκεντρώσεων στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε, τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά, οπότε προτιμήθηκε η χρησιμοποίηση της μεθόδου ELISA που αναφέρθηκε.

B.2.4. Συγκριτική μελέτη της ικανότητας απομόνωσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων διαφόρων εκλεκτικών υποστρωμάτων

Μελετήθηκε η ικανότητα απομόνωσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων υπαρχόντων εκλεκτικών υποστρωμάτων ενώ παράλληλα έγινε προσπάθεια ανάπτυξης νέων υποστρωμάτων τροποποιώντας τη σύνθεση υπαρχόντων υποστρωμάτων.



B.2.4.1. Μελέτη των υπαρχόντων στερεών και υγρών υποστρωμάτων

Συνολικά ελέγχθηκαν 6 υποστρώματα (3 στερεά και 3 υγρά υποστρώματα). Η σύνθεση των υποστρωμάτων που μελετήθηκαν αναγράφεται στον Πίνακα 16.

Τα υποστρώματα που μελετήθηκαν ήταν τα εξής:

- 1) το υπόστρωμα *Niven*, στερεό και υγρό (Niven και συν., 1981),
- 2) το υπόστρωμα *M – Niven (Modified Niven)*, στερεό και υγρό (Yoshinaga and Frank, 1982)
- 3) το υπόστρωμα *Møller decarboxylase medium*, στερεό και υγρό (Atlas, 1995). Το υπόστρωμα αυτό περιέχει φωσφορική πυριδοξάλη, η οποία είναι συνένζυμο των αποκαρβοξυλασών των Gram αρνητικών βακτηρίων και η οποία δεν περιέχεται στο Niven ή στο M – Niven.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των παραπάνω υποστρωμάτων, καθώς και των υποστρωμάτων που αναπτύξαμε, ήταν τα εξής:

- Τρυπτόνη (EZMix Tryptone T – 2559, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA).
- Beef extract (B – 4888, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA).
- Yeast extract (07 – 079, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain).
- Χλωριούχο νάτριο (Sodium Chloride for analysis, 1.06404, Merck KgaA, Darmstadt, Germany).
- Ανθρακικό ασβέστιο (Calcium Carbonate 20,293 – 2, Aldrich Chemical Co, Milwaukee, USA).
- Γλυκόζη (α -D-Glucose analytical grade 17023051, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany).
- Άγαρ (Purified Agar, L – 28, Oxoid Ltd, Hampshire, England).
- Bromocresol purple (1.03025, Merck KgaA, Darmstadt, Germany).
- Cresol red (Cresol Red for analysis, 11,44–2, Aldrich Chemical Co, Milwaukee, USA).
- Φωσφορική πυριδοξάλη (Pyridoxal 5'-Phosphate, P9255, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA).

Τα αντίστοιχα υγρά θρεπτικά υποστρώματα είχαν την ίδια σύσταση αλλά δεν περιείχαν άγαρ. Το pH των υποστρωμάτων ρυθμίστηκε πριν την αποστείρωση. Όλα τα υποστρώματα αποστειρώθηκαν στους 121°C για 10 min, έτσι ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα σχηματισμού ενώσεων Amadori από τα σάκχαρα και την ιστιδίνη των υποστρωμάτων



(Hernández – Hegero και συν., 1999). Τα υποστρώματα επωάστηκαν για 24 ώρες στους 37°C για έλεγχο της στειρότητάς τους.

Το Niven άγαρ έχει χρώμα κυανοπράσινο όταν είναι στείρο. Η εμφάνιση μωβ χρώματος στο Niven άγαρ σε συνδυασμό με την παρουσία άλω ίδιου χρώματος γύρω από την αποικία λαμβανόταν ως θετικό αποτέλεσμα. Αντίστοιχα στο θρεπτικό ζωμό Niven η αλλαγή του χρώματος του ζωμού από κυανοπράσινο σε μωβ σε συνδυασμό με την παρουσία αερίου στον ανεστραμμένο σωλήνα Durham λαμβανόταν ως θετικό αποτέλεσμα.

Το M – Niven άγαρ έχει χρώμα πορτοκαλί όταν είναι στείρο. Η εμφάνιση κόκκινου – ιώδους χρώματος στο M – Niven άγαρ σε συνδυασμό με την παρουσία άλω ίδιου χρώματος γύρω από την αποικία λαμβανόταν ως θετικό αποτέλεσμα. Αντίστοιχα στο θρεπτικό ζωμό M – Niven η αλλαγή του χρώματος του ζωμού από πορτοκαλί σε κόκκινο – ιώδες σε συνδυασμό με την παρουσία αερίου στον ανεστραμμένο σωλήνα Durham λαμβανόταν ως θετικό αποτέλεσμα.

Πίνακας 16. Σύνθεση υποστρωμάτων αποκαρβοξυλίωσης

	Niven	M – Niven	Møeller decarboxylase
Τρυπτόνη	0,5%	0,5%	0,5%
Beef extract			0,5%
Yeast extract	0,5%	0,5%	
L-ιστιδίνη	2,7%	2%	1%
NaCl	0,5%	0,5%	
CaCO ₃	0,1%		
Γλυκόζη			0,05%
Άγαρ	1,5%	1,5%	1,5%
Bromocresol purple	0,006%		0,001%
Cresol Red		0,02%	0,0005%
Φωσφορική πυριδοξάλη			0,0005%
pH	5,30	6,50	6,00

Το Møeller decarboxylase άγαρ (MD agar) έχει χρώμα κυανοπράσινο όταν είναι στείρο. Η εμφάνιση γαλάζιου χρώματος στο MD άγαρ λαμβανόταν ως θετικό αποτέλεσμα. Αντίστοιχα στο θρεπτικό ζωμό MD η αλλαγή του χρώματος του ζωμού από κυανοπράσινο σε μωβ σε συνδυασμό με την παρουσία αερίου στον ανεστραμμένο σωλήνα Durham λαμβανόταν ως θετικό αποτέλεσμα.



Στην Εικόνα 8 φαίνονται τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν.



Niven

Modified Niven

Møeller

Εικόνα 8. Στερεά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν

B.2.4.2. Μελέτη νέων υποστρωμάτων που αναπτύξαμε τροποποιώντας τη σύνθεση υπάρχοντων υποστρωμάτων για την απομόνωση ισταμινοπαραγω-γών βακτηρίων

Με βάση το Niven broth παρασκευάστηκαν 17 υγρά υποστρώματα πτωχά σε θρεπτικά στοιχεία τα οποία διέφεραν ως προς το pH, την ποσότητα τρυπτόνης που περιείχαν, την προσθήκη ή μη φωσφορικής πυριδοξάλης και την ποσότητα ιστιδίνης.

Ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις τρυπτόνης (0,1%, 0,5% και 1%), δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ιστιδίνης (2% και 4%), δύο διαφορετικές τιμές pH (6,00 και 6,50) και η αναγκαιότητα προσθήκης φωσφορικής πυριδοξάλης.

Η σύνθεσή τους αναγράφεται στους Πίνακες 17 και 18.

Πίνακας 17. Σύνθεση υγρών υποστρωμάτων πτωχών σε θρεπτικά στοιχεία με pH=6,00

	1	2	3	4	5	6	7	8
NaCl	0,5%							
Cresol red	0,02%							
Τρυπτόνη	0,5%	1%	0,5%	1%	0,5%	1%	0,5%	1%
L-ιστιδίνη	2%		4%		2%		4%	
Φωσφορική πυριδοξάλη	0				0,1%			

Πίνακας 18. Σύνθεση υγρών υποστρωμάτων πτωχών σε θρεπτικά στοιχεία με pH=6,50

	9	10	11	12	13	14	15	16	17
NaCl	0,5%								
Cresol red	0,02%								
Tryptone	0,1%	0,5%	1%	0,5%	1%	0,5%	1%	0,5%	1%
L-ιστιδίνη	2%			4%		2%		4%	
Φωσφορική πυριδοξάλη	0					0,1%			

Μετά τη διάλυση των συστατικών, το pH των υποστρωμάτων ρυθμίστηκε στην ανάλογη τιμή με χρήση pHμέτρου (El Hama PBS 720, El Hama Instruments, PO Rosh – Pina, Israel) και τα υποστρώματα αποστειρώθηκαν στους 121°C για 10 min, ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα σχηματισμού ενώσεων Amadori από τα σάκχαρα και την ιστιδίνη των υποστρωμάτων (Hernández – Herrero και συν., 1999).

Στη συνέχεια ποσότητα 5 ml κάθε υποστρώματος ενοφθαλμίστηκε με 100 μl 24ωρης καλλιέργειας βακτηρίων και επώαστηκε στους 37°C για 72 h.

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: *Morganella morganii* (στέλεχος υπ. αριθμ. 030' ταχύς παραγωγός ισταμίνης), *Morganella morganii* (στέλεχος υπ. αριθμ. 184' βραδύς παραγωγός ισταμίνης), *Escherichia coli* (στέλεχος υπ. αριθμ. 254' βραδύς παραγωγός ισταμίνης) και *Klebsiella pneumoniae* (στέλεχος υπ. αριθμ. 344' βακτήριο που δεν παράγει ισταμίνη).

Πίνακας 19. Σύνθεση υποστρωμάτων μαρτύρων

	1-3	2-4	5-7	6-8	9	10-12	11-13	14-16	15-17
NaCl	0,5%								
Cresol red	0,02%								
Tryptone	0,5%	1%	0,5%	1%	0,1	0,5%	1%	0,5%	1%
Φωσφορική πυριδοξάλη	0		0,1%		0			0,1%	
L-ιστιδίνη	0								
pH	6,00				6,50				



Κάθε 24 h καταγραφόταν η εμφάνιση και το χρώμα του υποστρώματος και μετά από 72 h επώασης καταγράφονταν το pH της καλλιέργειας. Κάθε πειραματισμός έγινε εις τριπλούν. Για κάθε νέο τροποποιημένο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας υπόστρωμα με την ίδια σύνθεση, αλλά χωρίς προσθήκη ιστιδίνης [Πίνακας 19].

B.2.5. Εργαστηριακή διερεύνηση του αιτίου της επιδημικής έξαρσης διαρροϊκής δηλητηρίασης εξαιτίας της κατανάλωσης μυδιών στη Θεσσαλονίκη

B.2.5.1. Ιστορικό

Κατά το χρονικό διάστημα από 14 έως 20 Ιανουαρίου 2000, περισσότερα από 120 άτομα ηλικίας 8 έως 70 ετών προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία των νοσοκομείων της Θεσσαλονίκης αναφέροντας συμπτώματα οξείας γαστρεντερίτιδας χωρίς την εμφάνιση πυρεξίας. Τα συμπτώματα, σύμφωνα με τις αναφορές των ασθενών, είχαν εμφανισθεί 30 λεπτά έως 10 ώρες μετά την κατανάλωση γεύματος μαγειρευμένων μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*). Η κατανάλωση των μυδιών είχε γίνει είτε στις οικίες των ασθενών είτε σε εστιατόρια και ταβέρνες της ευρύτερης περιοχής της πόλης της Θεσσαλονίκης. Τα συμπτώματα των ασθενών ήταν διάρροια, έμετος, ναυτία, κοιλιακοί σπασμοί και ρίγη. Όλοι οι νοσηλευόμενοι ασθενείς ανάρρωσαν πλήρως εντός 12 – 36 ωρών από τη χορήγηση της συμπτωματικής θεραπείας που περιλάμβανε τη χορήγηση φυσιολογικού ορού. Δείγματα κοπράνων που ελήφθησαν από τους ασθενείς εξετάστηκαν για τα συνήθη βακτηριακά, ιικά και παρασιτικά αίτια που προκαλούν γαστρεντερίτιδα, αλλά οι εξετάσεις ήταν αρνητικές. Η απουσία εργαστηριακών ευρημάτων, καθώς και το κοινό ιστορικό της κατανάλωσης μυδιών αμέσως πριν την εκδήλωση των συμπτωμάτων, ήταν ενδεικτικά διαρροϊκής δηλητηρίασης από κατανάλωση δίθυρων (Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP).





Εικόνα 9. Σημεία αλίευσης των εξετασθέντων δειγμάτων μυδιών

Οι ασθενείς ανέφεραν ότι τα μύδια που κατανάλωσαν κατ' οίκον είχαν αγορασθεί νωπά από τοπικά ιχθυοπωλεία και υπεραγορές της περιοχής Θεσσαλονίκης. Τα νωπά μύδια (*Mytilus galloprovincialis*) που πωλούνται στη Θεσσαλονίκη και στις περισσότερες περιοχές της βόρειας και βορειοδυτικής Ελλάδας προέρχονται κυρίως από ιχθυοκαλλιέργειες της περιοχής της Χαλάστρας του Θερμαϊκού κόλπου. Οι Διευθύνσεις Κτηνιατρικής και Αλιείας της Θεσσαλονίκης ανέφεραν αυξημένο αριθμό δινομαστιγωτών του τοξικού γένους *Dinophysis* spp. που κυμαίνονταν μεταξύ 3×10^4 και $5,4 \times 10^4$ κύτταρα/L, με ορισμένα από τα εξετασθέντα δινομαστιγωτά να έχουν τα χαρακτηριστικά των *D. acuminata* και *D. sacculus* (Koukaras και Nikolaidis, 2002). Οι κτηνιατρικές αρχές ειδοποιήθηκαν άμεσα για τη διενέργεια των κατάλληλων ενεργειών (απαγόρευση εξαλίευσης οστρακοειδών, απόσυρση των οστρακοειδών από την αγορά). Μετά τον Ιανουάριο και για τα επόμενα δύο χρόνια δεν παρουσιάστηκαν άλλα διαρροϊκά επεισόδια σχετιζόμενα με κατανάλωση μυδιών. Παρόλα ταύτα οι αρχές επέβαλαν συχνά απαγορεύσεις εξαλίευσης μυδιών μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα, λόγω ανίχνευσης τοξικών δινομαστιγωτών στα θαλάσσια ύδατα.



B.2.5.2. Ανίχνευση διαρροϊκών τοξινών σε δίθυρα

B.2.5.2.1. Δείγματα

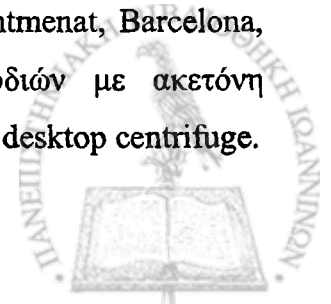
Μεταξύ Ιανουαρίου 2000 και Απριλίου 2002 εξετάσθηκαν για την παρουσία τοξινών του διαρροϊκού συνδρόμου των δίθυρων 10 δείγματα ναυπών μυδιών των 500 g το καθένα. Δύο από τα δέκα δείγματα εστάλησαν στην Μονάδα Μικροβιολογίας Τροφίμων του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας Τροφίμων της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από το Νοσοκομείο Λοιμωδών Νοσημάτων της Θεσσαλονίκης κατά τη διάρκεια της επιδημικής έξαρσης στη Θεσσαλονίκη τον Ιανουάριο του 2000. Τα υπόλοιπα δείγματα συλλέχθηκαν από ιχθυοπωλεία. Επτά από τα δείγματα είχαν αλιευτεί από τη θαλάσσια περιοχή της Χαλάστρας του Θερμαϊκού κόλπου του νομού Θεσσαλονίκης και ένα από τη θαλάσσια περιοχή της Πρέβεζας του Αμβρακικού κόλπου.

Όλα τα δείγματα ναυπών μυδιών μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό κατάψυξη αμέσως μετά τη συλλογή τους και αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη (-30°C) μέχρι να εξετασθούν. Για τον περαιτέρω μικροβιολογικό έλεγχο τα δείγματα αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, καθαρίστηκαν με πόσιμο νερό και βούρτσα για την απομάκρυνση εξωγενών υλικών και ελήφθη εδώδιμο τμήμα μυδιών βάρους περίπου 200 g, το οποίο ομογενοποιήθηκε σε ομογενοποιητή (Hamilton Beach, model 1GC00CK, Washington, USA). Πριν την εκχύλιση των τοξινών, 100 g ομογενοποιημένης σάρκας ζυγίστηκαν σε ζυγό Ohaus model 1500D (Ohaus Co, Pine Brook, USA).

B.2.4.2.2. Εκχύλιση των τοξινών

Η εκχύλιση των τοξινών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη διαπιστευμένη μέθοδο του Marine Laboratory, Aberdeen, UK, που είναι το εγκεκριμένο από την Ευρωπαϊκή Ένωση εργαστήριο αναφοράς του Ηνωμένου Βασιλείου για τις θαλάσσιες βιοτοξίνες. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν αυτή των Yasumoto και συν. (1984) με ορισμένες τροποποιήσεις.

Ποσότητα 100 g ομογενοποιημένης σάρκας μυδιών επαναομογενοποιήθηκε τρεις φορές με 100 ml ακετόνης (Acetone Analar grade, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain) σε θερμοκρασία δωματίου. Η ομογενοποιημένη σάρκα μυδιών με ακετόνη φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm για 10 min σε φυγόκεντρο Sorvall GLC-4 desktop centrifuge.



Μετά τη φυγοκέντρωση η ακετόνη απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό με φυγοκεντρική εξάτμιση για 1 h στους 60°C ή μέχρι την εξάτμιση όλης της ακετόνης. Ο φυγοκεντρικός εξάτμιστής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Eyela type N rotary evaporator (Eyela Co, Tokyo Japan).

Το υπόλειμμα μετά την εξάτμιση της ακετόνης εκχυλίστηκε με ίσο όγκο διαιθυλαιθέρα (Diethyl ether Analytical grade, ET 0081, Scharlau Chemie S.A., Sentmenat, Barcelona, Spain) εις διπλούν. Από το ομογενοποίημα με διαιθυλαιθέρα ελήφθη η οργανική φάση και εκπλύθηκε με 2 ml απεσταγμένου νερού εις διπλούν. Ο αιθέρας απομακρύνθηκε με φυγοκεντρική εξάτμιση στους 65°C για 2 έως 4 h ή έως απουσίας αιθέρα. Το υπόλειμμα διαλύθηκε σε 4 ml υδατικού διαλύματος 1% Tween 60 (Merck KgaA, Darmstadt, Germany).

B.2.4.2.3. Βιολογική μέθοδος με χρήση ποντικών

Χρησιμοποιήθηκαν λευκά ποντίκια BALB-C βάρους 19 έως 21 g. Τα ποντίκια ζυγίστηκαν πριν την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 1ml του εκχυλίσματος μυδιών. Κάθε εκχύλισμα δείγματος μυδιών χορηγήθηκε σε τρία ποντίκια. Τα ποντίκια στα οποία ενέθηκε εκχύλισμα μυδιών και οι μάρτυρες επιτηρήθηκαν για 24 ώρες, συνεχώς για τις πρώτες 6 ώρες και ανά ώρα στη συνέχεια έως την 24η ώρα. Στην περίπτωση απουσίας συμπτωμάτων τοξίκωσης, τα ποντίκια κρατούνταν για άλλες 24 ώρες και στη συνέχεια ευθανατώνονταν. Όλες οι μεταβολές στη συμπεριφορά των πειραματόζων καταγράφονταν λεπτομερώς. Τα συμπτώματα που θεωρήθηκαν ως χαρακτηριστικά τοξίκωσης από διαρροϊκές τοξίνες των δίθυρων ήταν η αρχική απάθεια, η γενικευμένη αδυναμία, η δυσκινησία, οι σπασμοί, η κυανίζουσα χροιά δέρματος, η κοπιώδης αναπνοή και ο θάνατος.



B.3. Αποτελέσματα

B.3.1. Μελέτη παραγωγής ισταμίνης σε δείγματα τόννου υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασιακής μεταχείρισης

Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης που μετρήθηκαν στα δείγματα τόννου κατά την παραλαβή τους, κυμαινόταν από 1 ppm έως 47,1 ppm, με την εξαίρεση τριών τόννων που είχαν συγκεντρώσεις ισταμίνης 70,4, 122,9 και 247,6 ppm. Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης των τόννων κατά τη διάρκεια της θερμικής κακομεταχείρισης παριστάνονται γραφικά στα Γραφήματα 5 – 8 και αναφέρονται στους Πίνακες 20 – 23. Αναλυτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

B.3.1.1. Πείραμα θερμικής κακομεταχείρισης

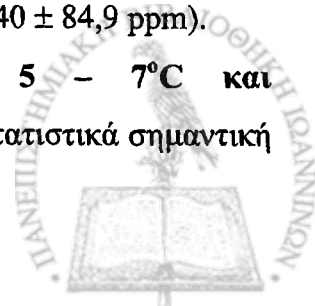
α. Πείραμα με νωπά φιλέτα τόννου (Γράφημα 5 και Πίνακας 20)

Τα νωπά φιλέτα τόννου, που συντηρούνταν στους 0 – 2°C και υπέστησαν κακομεταχείριση στους 25°C για 1 h καθημερινά, είχαν αρχικές συγκεντρώσεις ισταμίνης μεταξύ 1 και 9 ppm. Κατά τη διάρκεια της θερμικής κακομεταχείρισης διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική ($p < 0,01$) αύξηση της συγκέντρωσης ισταμίνης, με τελική συγκέντρωση ισταμίνης που κυμάνθηκε μεταξύ 93 και 110 ppm ($101,5 \pm 6,1$). Οι συγκεντρώσεις αυτές δεν θεωρούνται τοξικές.

Τα νωπά φιλέτα τόννου που συντηρήθηκαν στους 0 – 2°C και υπέστησαν κακομεταχείριση στους 25°C για 3 h καθημερινά, εμφάνισαν ταχύτερη αύξηση της συγκέντρωσης ισταμίνης, με συγκεντρώσεις ισταμίνης που κυμάνθηκαν μεταξύ 1520 και 3480 ppm (2500 ± 693 ppm) μετά από 11 ημέρες θερμικής κακομεταχείρισης και οι οποίες ήταν ιδιαίτερα τοξικές.

Στα νωπά φιλέτα τόννου που συντηρήθηκαν στους 5 – 7°C και κακομεταχειρίστηκαν στους 25°C για 1 h καθημερινά, οι τελικές συγκεντρώσεις ισταμίνης ήταν τοξικές και κυμάνθηκαν μεταξύ 1120 και 1360 ppm ($1240 \pm 84,9$ ppm).

Τα νωπά φιλέτα τόννου που συντηρήθηκαν στους 5 – 7°C και κακομεταχειρίστηκαν στους 25°C για 3 h καθημερινά, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική



($p < 0,02$) αύξηση της συγκέντρωσης ισταμίνης, με τελικές συγκεντρώσεις ιδιαίτερα τοξικές, που κυμάνθηκαν μεταξύ 1800 και 3000 ppm ($2100 \pm 183,8$ ppm).

β. Πείραμα με ολόκληρους τόννους (Γραφήματα 6 – 8 και Πίνακες 21 – 23)

Πρώτη ομάδα:

Αποψυγμένοι τόννοι που συντηρήθηκαν στους 3 – 4°C και υπέστησαν κακομεταχείριση στους 20°C για 2 h καθημερινά. Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης που μετρήθηκαν ήταν μικρές (<60 ppm) και το ίδιο παρατηρήθηκε και στους μάρτυρες [Γράφημα 7]. Μόνο ένας από τους τόννους που υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση εμφάνισε μεγαλύτερη συγκέντρωση ισταμίνης (127,4 ppm). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών σχημάτων απόψυξης. Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης που μετρήθηκαν στο τέλος του πρωτόκολλου θερμικής κακομεταχείρισης ήταν μη τοξικές.

Δεύτερη ομάδα:

1) Νωποί τόννοι που συντηρήθηκαν στους 0-2°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά. Μετρήθηκαν αυξημένες, αλλά όχι στατιστικά σημαντικές ($p > 0,10$) συγκεντρώσεις ισταμίνης (67 – 382 ppm) [Γράφημα 6]. Στο τέλος του πρωτόκολλου κακομεταχείρισης οι μάρτυρες και οι αποψυγμένοι τόννοι που υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση ήταν ασφαλείς για κατανάλωση, ενώ οι νωποί τόννοι ήταν δυνητικά τοξικοί.

2) Αποψυγμένοι τόννοι που συντηρήθηκαν στους 0-2°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά. Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης ήταν μικρές (<70 ppm) και το ίδιο παρατηρήθηκε στους μάρτυρες (νωποί τόννοι χωρίς θερμική κακομεταχείριση).

Τρίτη ομάδα:

1) Νωποί τόννοι (μάρτυρες) που συντηρήθηκαν στους 6-7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά. Παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) στη συγκέντρωση ισταμίνης των μαρτύρων. Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης των μαρτύρων μετά το τέλος του πρωτοκόλλου κυμάνθηκαν μεταξύ 228,3 και 584,2 ppm [Γράφημα 8].

2) Νωποί τόννοι που συντηρήθηκαν στους 6-7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά. Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης που μετρήθηκαν μετά το τέλος του πρωτόκολλου κακομεταχείρισης ήταν ιδιαίτερα αυξημένες (544,5 – 4156,6 ppm).



Μετά το τέλος του πρωτόκολλου κακομεταχείρισης οι μάρτυρες ήταν δυνητικά τοξικοί, οι αποψυγμένοι τόννοι ήταν τοξικοί, ενώ οι νωποί τόννοι ήταν ιδιαίτερα τοξικοί.

3) Αποψυγμένοι τόννοι που συντηρήθηκαν στους 6-7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά. Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης μετά το τέλος του πρωτόκολλου ήταν γενικά μεγαλύτερες από αυτές των μαρτύρων (124,7 – 2435,8 ppm). Η συγκέντρωση ισταμίνης του ενός από τους τρεις αποψυγμένους τόννους ήταν εξ αρχής μεγαλύτερη (248 ppm). Αυτός ο τόννος είχε την μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση ισταμίνης μεταξύ των τριών αποψυγμένων τόννων της ομάδας (2435 ppm).

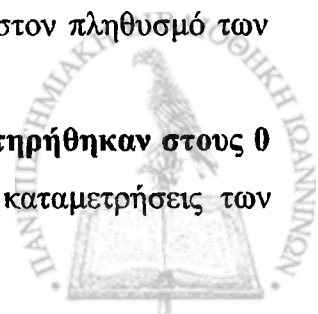
B.3.1.2. Μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων τόννου

Τα αποτελέσματα της ποσοτικής μικροβιολογικής εξέτασης των δειγμάτων τόννου παρουσιάζονται στους Πίνακες 20 – 23, ενώ τα είδη των βακτηρίων που απομονώθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 24.

Στα φιλέτα τόννου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μικροβιολογικές παραμέτρους που εξετάστηκαν. Μετά από 11 ημέρες διαφορετικών σχημάτων συντήρησης, στα οποία υποβλήθηκαν τα φιλέτα τόννου, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μετρήσεις των μικροβιολογικών παραμέτρων μεταξύ των μαρτύρων και των φιλέτων που υποβλήθηκαν σε θερμική κακομεταχείριση. Σε όλα τα φιλέτα μετά από 11 ημέρες συντήρησης η ολική μεσόφιλη χλωρίδα στους 30°C υπερέβαινε το ανώτερο όριο ανίχνευσης των $2,1 \times 10^8$ cfu/g. Η κυρίαρχη ομάδα βακτηρίων σε αυτό το στάδιο ήταν τα Οξυγαλακτικά βακτήρια [Πίνακας 20]. Δεν ανιχνεύθηκαν βακτήρια του γένους *Vibrio* spp..

Στους αποψυγμένους τόννους που συντηρήθηκαν στους 3 – 4°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 20°C δε βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των μαρτύρων και των κακομεταχειρισμένων τόννων [Πίνακας 21]. Οι καταμετρήσεις των Εντεροβακτηριακών, των Κολοβακτηριοειδών και των Εντεροβακτηριακών που δεν ζυμώνουν τη λακτόζη αυξήθηκαν κατά $2,5 - 3,2 \log_{10}$, $2,1 - 2,8 \log_{10}$ και $2,4 - 4,7 \log_{10}$ αντίστοιχα, ενώ η ολική μεσόφιλη χλωρίδα στους 30°C, τα Οξυγαλακτικά βακτήρια και οι Ψευδομονάδες αυξήθηκαν κατά $2,7 - 4,5 \log_{10}$, $3,1 - 5 \log_{10}$ και $1,5 - 5,7 \log_{10}$ αντίστοιχα μετά από επτά ημέρες συντήρησης. Μικρές διαφορές καταγράφηκαν στον πληθυσμό των θειοαναγωγικών βακτηρίων με την πάροδο του χρόνου.

Στους νωπούς και αποψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 0 – 2°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C οι καταμετρήσεις των



Εντεροβακτηριακών, των Κολοβακτηριοειδών και των Εντεροβακτηριακών που δεν ζυμώνουν την λακτόζη αυξήθηκαν κατά περίπου $2 \log_{10}$ ($1,9 - 2,7 \log_{10}$, $1,1 - 2,4 \log_{10}$ και $2 - 2,7 \log_{10}$ αντίστοιχα) [Πίνακας 22]. Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα στους 30°C και οι καταμετρήσεις των Σταφυλόκοκκων, των Οξυγαλακτικών βακτηρίων και των Ψευδομονάδων αυξήθηκαν κατά $1,4 - 2,6 \log_{10}$, $2 - 4,4 \log_{10}$ and $2,2 - 2,3 \log_{10}$ αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μαρτύρων και των θερμικά κακομεταχειρισμένων τόννων.

Στους νωπούς και αποψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους $6 - 7^{\circ}\text{C}$ και υπέστησαν κακομεταχείριση στους 30°C διαπιστώθηκε αύξηση στην ολική μεσόφιλη χλωρίδα στους 30°C και στις καταμετρήσεις των Σταφυλόκοκκων ($3,0 - 4,1 \log_{10}$), των Οξυγαλακτικών βακτηρίων ($2,6 - 3,4 \log_{10}$) και των Ψευδομονάδων ($2,5 - 5,5 \log_{10}$) [Πίνακας 23]. Στο τέλος του πρωτόκολλου κακομεταχείρισης οι καταμετρήσεις των Εντεροβακτηριακών, των Κολοβακτηριοειδών και των Εντεροβακτηριακών που δεν ζυμώνουν τη λακτόζη αυξήθηκαν περίπου κατά $3,0 \log_{10}$ ($3,2 \log_{10}$, $3,5 \log_{10}$ και $2,9 \log_{10}$ αντίστοιχα) στους θερμικά κακομεταχειρισμένους τόννους σε αντιδιαστολή με την αύξηση κατά $1,0 \log_{10}$ στους μάρτυρες σε αυτές τις καταμετρήσεις.

Για την εκτίμηση της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ της παραγόμενης ισταμίνης και των βακτηριακών νααμετρήσεων, σχεδιάστηκαν τυχαίες κατανομές του λογαρίθμου των βακτηριακών καταμετρήσεων έναντι της συγκέντρωσης ισταμίνης με εκθετική γραμμική τάση. Ο παράγοντας συσχέτισμού r^2 ήταν μεγαλύτερος του 0,5 στις τυχαίες κατανομές της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, των ολικών Εντεροβακτηριακών και των κολοβακτηριοειδών ανεξάρτητα από το σχήμα συντήρησης που χρησιμοποιήθηκε. Ειδικά στους τόννους που συντηρήθηκαν στους $6 - 7^{\circ}\text{C}$ ο παράγοντας συσχέτισμού r^2 πλησίαζε την μονάδα [Γραφήματα 9, 10 και 11].



Πίνακας 20. Μέση τιμή συγκέντρωσης ισταμίνης και δεκαδικών λογαρίθμων καταμετρήσεων μικροβίων σε νοπά φιλέτα τόννου που συντηρήθηκαν στους 0-2°C και στους 5-7°C και υλίστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 25°C

Ημέρες	Ισταμίνη (ppm)	OMX (cfu/g)	Εντεροβακτηριακά (cfu/g)	Κολοβακτηριοειδή (cfu/g)	Εντεροβακτηριακά λακτόζη αρνητικά (cfu/g)	Σταφυλόκοκκοι (cfu/g)
1 h θερμικής κακομεταχείρισης στους 25°C, συντήρηση στους 0-2°C						
0	5 (2,8) *	4,9 (1,2) *	5,8 (0,6)	3 (0,1)	5,8 (0,6)	4,3(0,9)
5	48 (0,7)					
11	101,5 (6)	>8,3	6,8 (0,2)	5,8 (0,3)	6,7 (0,2)	7,2(0,1)
3 h θερμικής κακομεταχείρισης στους 25°C, συντήρηση στους 0-2°C						
0	14,5 (0,3)	6,1 (0,2)	5,5 (0,1)	3,5 (0,1)	5,5 (0,1)	4,6 (1,1)
5	122,2 (69,1)					
11	2500 (693)	>8,3	7,7 (0,2)	5,8 (0,1)	7,7 (0,2)	8,1 (0,1)
1 h θερμικής κακομεταχείρισης στους 25°C, συντήρηση στους 5-7°C						
0	15 (0,3)	6,4 (0,1)	5,4 (0,1)	2,6 (0,2)	5,4 (0,1)	3,2 (0,1)
5	365 (194,1)					
11	1240 (84,8)	>8,3	7,8 (0,1)	4,6 (0,3)	7,8 (0,1)	7,74 (0,3)
3 h θερμικής κακομεταχείρισης στους 25°C, συντήρηση στους 5-7°C						
0	14,5 (1,1)	6,1 (0,3)	5,3 (0,2)	2,6 (0,2)	5,3 (0,2)	4,4 (1)
5	142,5 (68,9)					
11	2140 (183,8)	>8,3	8 (0,2)	6 (0,2)	8 (0,2)	8,3 (0,1)

* εντός παρενθέσεως το τυπικό σφάλμα

Πίνακας 21. Μέση τιμή συγκέντρωσης ισταμίνης και δεκαδικών λογαριθμών καταμετρήσεων μικροβίων σε κατεψυγμένους ολόκληρους τόνους που συντηρήθηκαν στους 3-4°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 20°C

Ημέρες	Ισταμίνη (ppm)	OMX (cfu/g)	Εντεροβακτηριακά (cfu/g)	Κολοβακτηριοειδή (cfu/g)	Εντεροβακτηριακά λακτόζη αρνητικά (cfu/g)	Σταφυλόκοκκοι (cfu/g)	Θειοναγωγικά βακτήρια (cfu/g)	Οξυγαλακτικά βακτήρια (cfu/g)	Ψευδομονάδες (cfu/g)
Μάρτυρες, συντήρηση στους 3-4°C. Απόψυξη σε θερμοκρασία ψυγείου									
0	11,4 (3,3) *	3,1	2,9	2,3	2,8	<2	<1	<2	2
5	31 (2,5)	5,4 (1,7)*	3,5 (1,1)	1,6 (1,2)	3,5 (1,1)	3,4 (2,4)	1,15 (0,8)	3,4 (2,4)	5,5 (0,9)
7	30 (6,1)	6,3 (1,1)	4 (1,2)	2,7 (1,9)	3,9 (1,1)	4,9 (1,6)	<1	3,6 (2,6)	5,9 (1,5)
2 h καθημερινής θερμικής κακομεταχείρισης στους 20°C, συντήρηση στους 3-4°C. Απόψυξη σε θερμοκρασία ψυγείου									
0	17,1 (0,5)	3,8 (0,4)	3,4 (0,2)	3,1 (0,3)	2,9 (0,1)	2,2 (0,9)	0,6 (0,5)	1,3 (1)	2,2 (1,1)
5	30,3 (0,6)	6,2 (0,5)	3,2 (0,4)	3,2 (0,5)	4,1 (0,8)	6 (0,3)	0,8 (0,6)	5,2 (0,6)	6,5 (0,2)
7	29,1 (1,7)	6,9 (0,5)	5,1 (0,6)	4,4 (0,7)	5,7 (0,3)	6,8 (0,2)	0,3 (0,3)	5,8 (0,6)	7,1 (0,5)
2 h καθημερινής θερμικής κακομεταχείρισης στους 20°C, συντήρηση στους 3-4°C. Απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου									
0	20,4 (0,6)	4,1 (0,8)	2,8 (0,4)	2,5 (0,2)	1,6 (0,7)	3,3 (0,6)	<1	2,2 (1,1)	3,3 (1,6)
5	32 (8,5)	6,4 (0,4)	5,1 (0,6)	3,3 (1,4)	5 (0,6)	5,9 (0,7)	1,4 (0,7)	5,4 (0,4)	6,4 (0,4)
7	36 (3,5)	8,1 (0,1)	6,6 (0,4)	3,9 (0,8)	6,7 (0,3)	6,6 (0,6)	<1	6,5 (0,5)	8
2 h καθημερινής θερμικής κακομεταχείρισης στους 20°C, συντήρηση στους 3-4°C. Απόψυξη σε φούρνο μικροκυμάτων									
0	16,6 (3,7)	4 (0,8)	3,5 (0,4)	2,8 (0,2)	3,3 (0,6)	1,1 (0,9)	<1	1,6 (0,6)	3,1 (1,5)
5	28,2 (6,5)	5,4 (1)	4,6 (0,7)	1,7 (1,4)	4,6 (0,7)	4,7 (1,1)	1,6 (0,7)	3,4 (1,4)	6,6 (0,3)
7	63 (26,4)	7 (0,8)	5,1 (1,4)	3,6 (1,5)	5,1 (1,4)	4,9 (2)	0,5 (0,4)	4,3 (1,9)	6,8 (0,7)

* εντός παρενθέσεως το τυπικό σφάλμα

Πίνακας 22. Μέση τιμή συγκέντρωσης ισταμίνης και δεκαδικών λογαριθμών καταμετρήσεων μικροβίων σε νοπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 0-2°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C

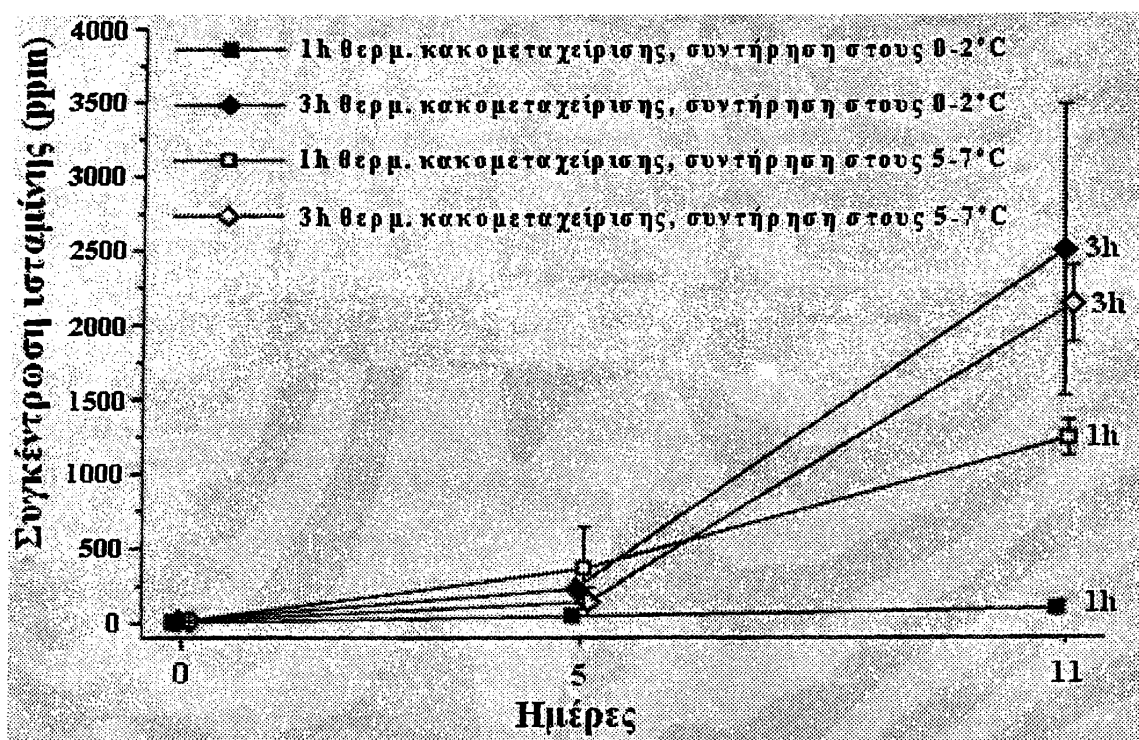
Ημέρες	Ισταμίνη (ppm)	OMX (cfu/g)	Εντεροβακτηριακά (cfu/g)	Κολοβακτηριοειδή (cfu/g)	Εντεροβακτηριακά λακτόζη – (cfu/g)	Σταφυλόκοκκοι (cfu/g)	Θειαναερόβια βακτήρια (cfu/g)	Οξυγαλακτι-κά βακτήρια (cfu/g)	Ψευδομονάδες (cfu/g)
Μάρτυρες, συντήρηση στους 0-2°C (Νωπός τόννος)									
0	44,1(18,6)*	4,8 (0,3) *	4 (0,3)	2,9 (0,3)	3,9 (0,3)	3,5 (0,1)	1,5 (0,3)	3,5	3,8 (0,3)
4	20,5 (2,5)								
8	50,7 (5,9)	6,8 (0,3)	5 (0,3)	4,2 (0,2)	5 (0,3)	5 (0,7)	1,2 (0,2)	5,4 (0,1)	5,9 (0,1)
12	33,5 (1,8)	7,4	6 (0,1)	2,3 (1,6)	6 (0,1)	6,4 (0,6)	1,3 (0,2)	6,5 (0,2)	6,4
2 h καθημερινής θερμικής κακομεταχείρισης στους 30°C, συντήρηση στους 0-2°C(Νωπός τόννος)									
0	73,3 (20,2)	5,6 (0,3)	4,1 (0,1)	3,5 (0,2)	3,7 (0,2)	4,4 (0,5)	1,7 (0,5)	4 (0,6)	4,6 (0,3)
4	30,6 (6,6)								
8	80,9 (30,6)	7,1 (0,2)	5,2 (0,5)	4,2 (0,4)	5,1 (0,5)	5,5 (0,3)	1,6 (0,6)	6,2 (0,1)	6,3 (0,4)
12	258,3 (79,2)	7,1 (0,2)	6 (0,6)	3,8 (1,6)	5,9 (0,6)	6,4 (0,4)	2,3 (0,2)	6,7 (0,3)	6,7 (0,3)
2 h καθημερινής θερμικής κακομεταχείρισης στους 30°C, συντήρηση στους 0-2°C. Απόλυση σε θερμοκρασία ψύξης									
0	28,8 (3,5)	4,8 (0,3)	3 (0,4)	2,7 (0,4)	2,2 (0,9)	3,6 (0,3)	1,7 (0,2)	3,7 (0,2)	4,2 (0,5)
4	50,5 (3)								
8	24 (2)	7,3 (0,1)	5 (0,2)	4 (0,2)	4,9 (0,2)	6,6 (0,3)	3 (0,4)	6,4 (0,3)	6,8 (0,3)
12	32,3 (6,4)	7,7	5,5	4,3 (0,3)	5,5	7,3 (0,5)	3,1 (0,2)	7 (0,4)	6,7 (0,1)

* εντός παρενθέσεως το τυλικό σφάλμα

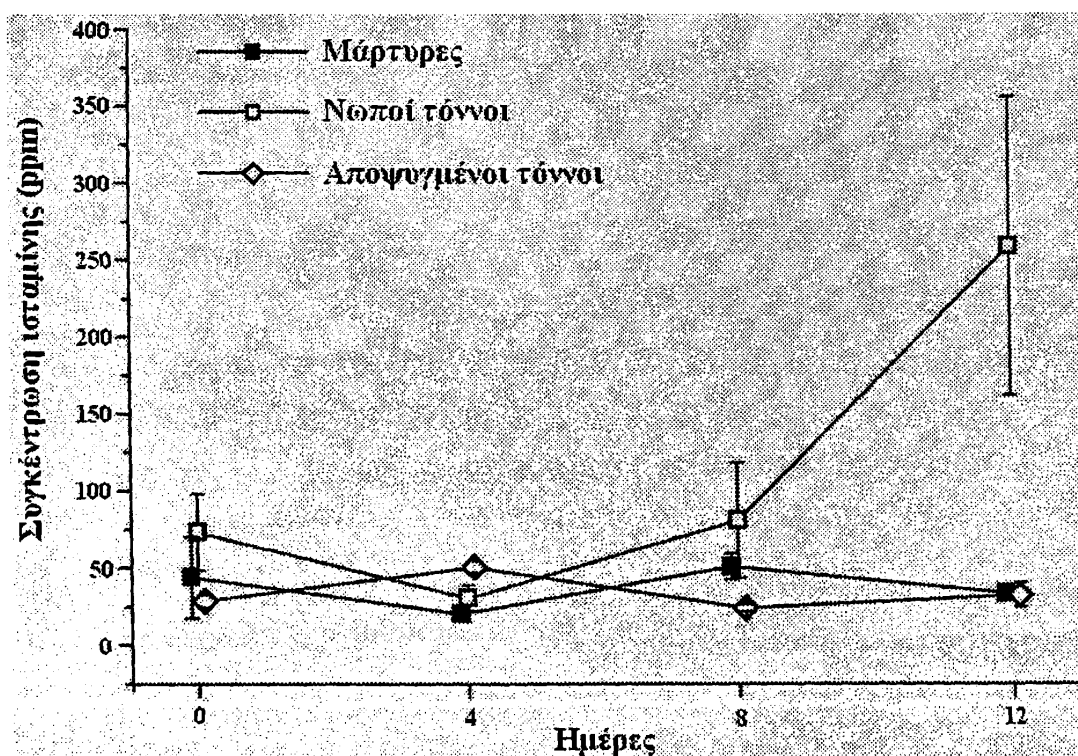
Πίνακας 23. Μέση τιμή συγκέντρωσης ισταμίνης και δεκαδικών λογαρίθμων καταμετρήσεων μικροβίων σε νοπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους που συντηρήθηκαν στους 6-7°C και υπέρστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C

Ημέρες	Ισταμίνη (ppm)	OMX (cfu/g)	Εντεροβακτηριακά (cfu/g)	Κολοβακτηριοειδή (cfu/g)	Εντεροβακτηριακά λακτόζη αρνητικά (cfu/g)	Σταφυλόκοκοι (cfu/g)	Θειαναγωγικά βακτήρια (cfu/g)	Οξυγαλακτικά βακτήρια (cfu/g)	Ψευδομονάδες (cfu/g)
Μάρτυρες, συντήρηση στους 6-7°C (Νωπός τόννος)									
0	99,3 (60,6) *	4,8 (0,3) *	3,5 (0,2)	2,9 (0,2)	3,3 (0,3)	1,9 (0,8)	0,3 (0,3)	4,7 (0,2)	3 (0,2)
4	48,2 (19,7)		4,6 (0,2)	3,6 (0,2)	4,4 (0,4)	5,7 (0,4)	1,7 (0,7)	7,2 (0,3)	5,2 (0,9)
8	147,3 (46,6)		4,8 (0,1)	3,8 (0,5)	4,4 (0,2)	5,9 (0,2)	1,6 (0,6)	7,6 (0,2)	7,2 (0,3)
12	350 (95,6)								
2 h καθημερινής θερμικής κακομεταχείρισης στους 30°C, συντήρηση στους 6-7°C (Νωπός τόννος)									
0	26,7 (7,72)	4,6	2,8 (0,4)	1,5 (0,6)	2,8 (0,4)	1,2 (1)	<1	5,1 (0,5)	1,4 (0,6)
4	429,6 (316,8)		4,9 (0,5)	4,4 (0,7)	4,3 (0,7)	5,5 (0,2)	0,3 (0,3)	6,3 (0,2)	5,5 (0,2)
8	769 (398)		5,8 (0,4)	5,1 (0,8)	5,3 (0,4)	6,2 (0,4)	1,6 (0,7)	7,8 (0,5)	6,9 (0,1)
12	1962 (908,6)								
2 h καθημερινής θερμικής κακομεταχείρισης στους 30°C, συντήρηση στους 6-7°C. Αποψύξη σε θερμοκρασία ψύξης									
0	99,3 (60,6)	4,6 (0,5)	3,5 (0,1)	0,9 (0,7)	3,5 (0,1)	3,2 (0,3)	0,3 (0,3)	3,8 (0,2)	2,2 (0,2)
4	921,6 (720,3)		5,8 (0,3)	4,1 (0,7)	5,8 (0,3)	6,4 (0,2)	0,3 (0,3)	6,6 (0,2)	6,1 (0,3)
8	318,5 (214,4)		6,42 (0,3)	4,9 (0,5)	6,3 (0,4)	6,9	3 (0,3)	7,2 (0,3)	6,7 (0,3)
12	1375,6 (550,3)								

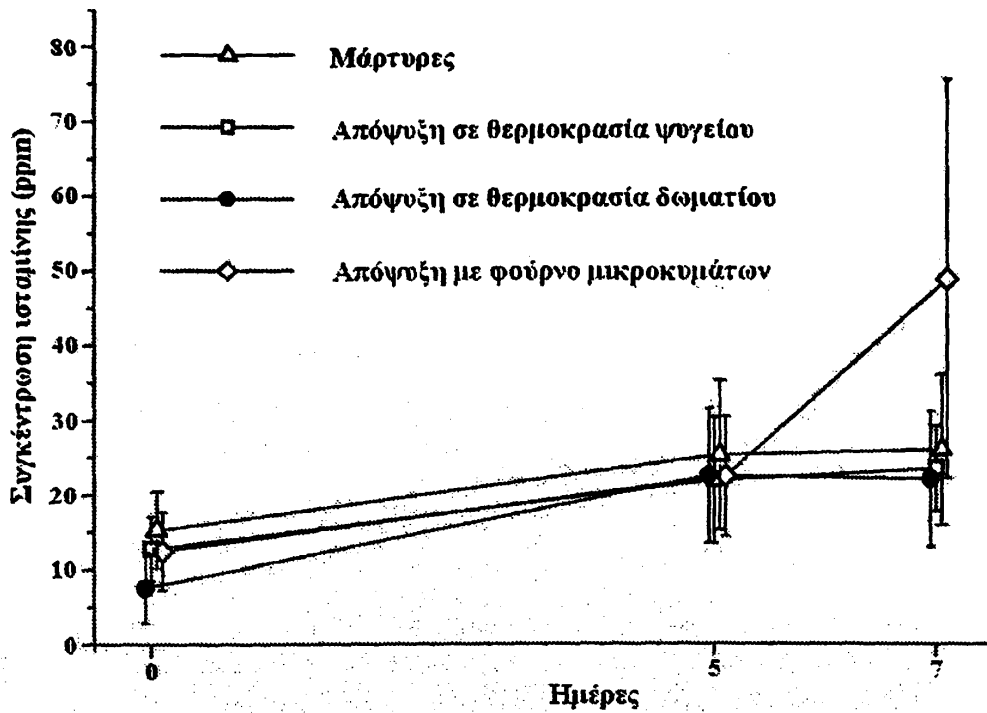
* εντός παρενθέσεως το τυπικό σφάλμα



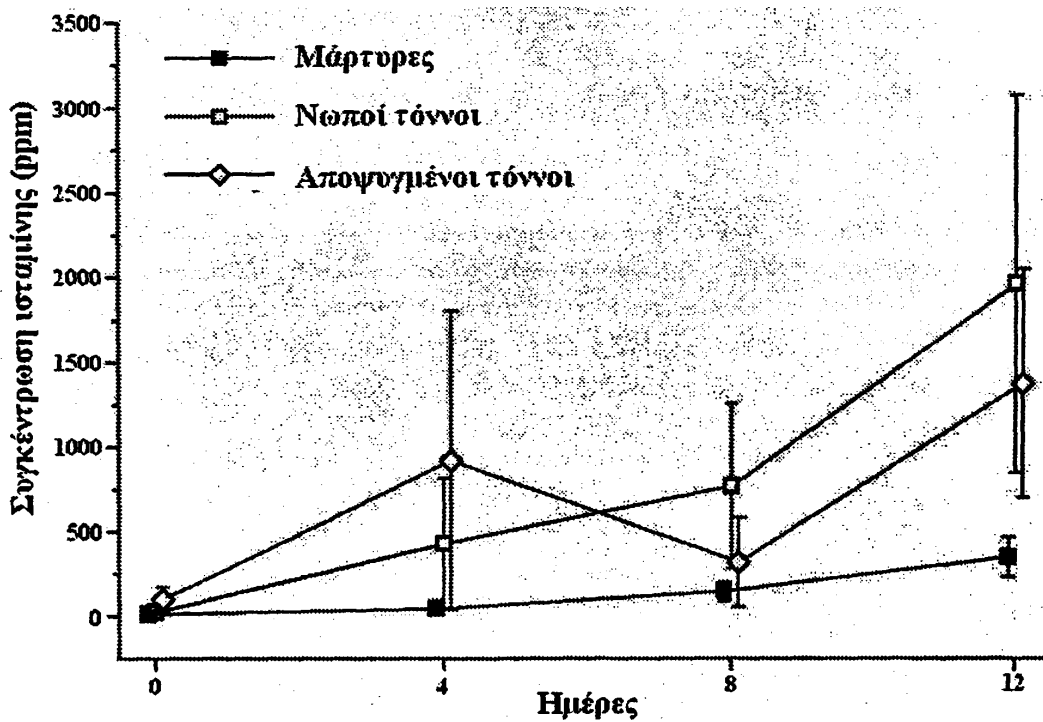
Γράφημα 5. Συγκέντρωση ισταμίνης σε νωπά φιλέτα τόννου που συντηρήθηκαν στους 0 – 2°C και 5 – 7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 25°C για 1 και 3 h καθημερινά



Γράφημα 6. Συγκέντρωση ισταμίνης σε νωπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 0 – 2°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά

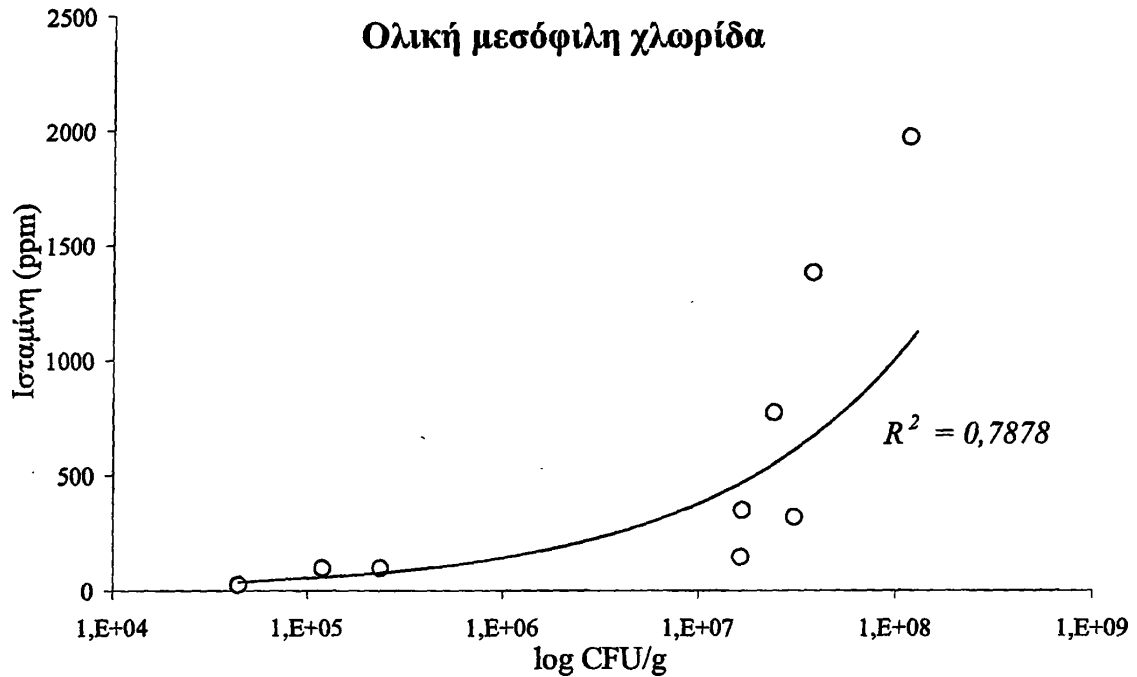


Γράφημα 7. Συγκέντρωση ισταμίνης σε κατεψυγμένους τόννους που συντηρήθηκαν στους 3 - 4°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 20°C για 2 h καθημερινά

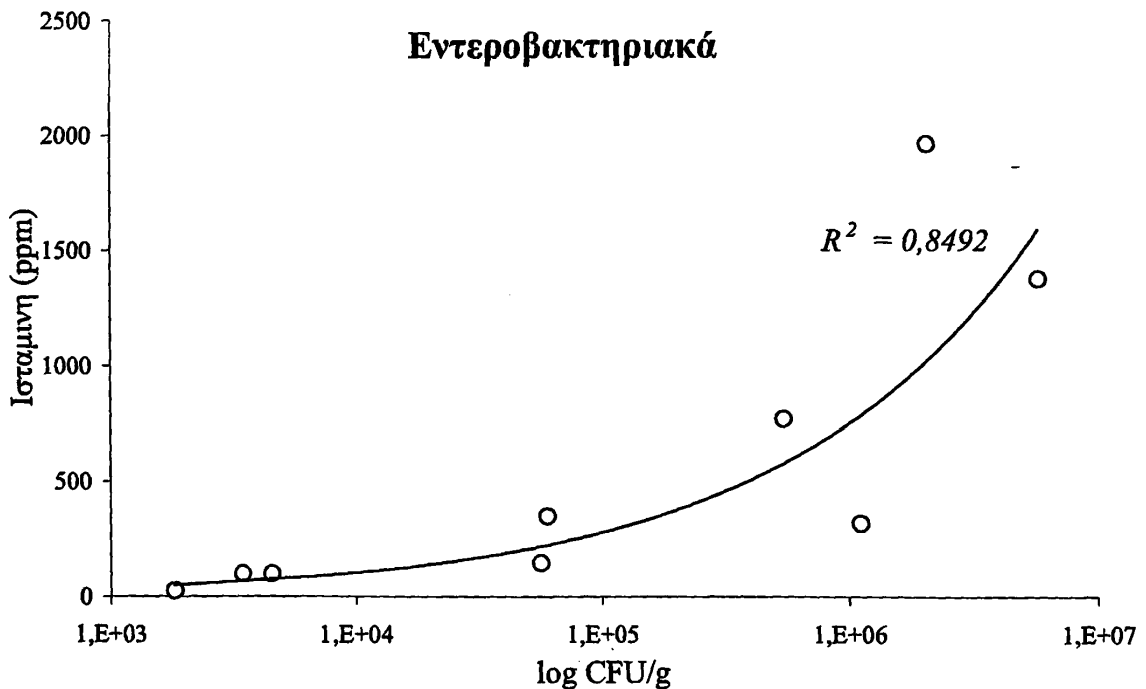


Γράφημα 8. Συγκέντρωση ισταμίνης σε νωπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 6 - 7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά



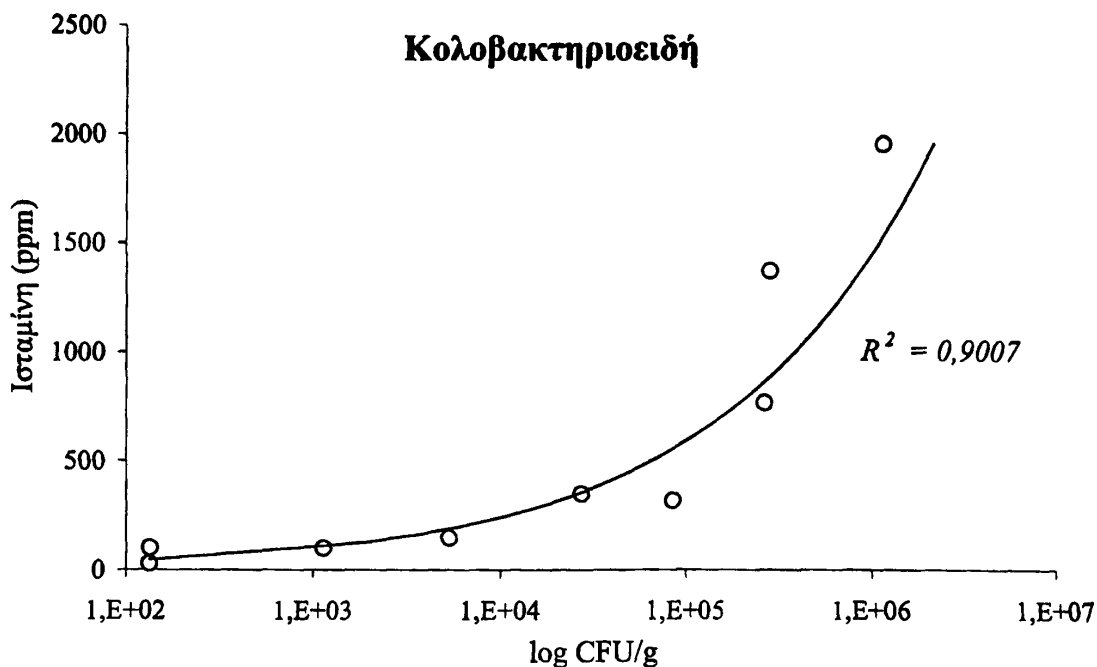


Γράφημα 9: Τυχαία κατανομή λογαρίθμων καταμετρήσεων ολικής μεσόφιλης χλωρίδας έναντι συγκεντρώσεων ισταμίνης σε ναπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 6–7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά



Γράφημα 10: Τυχαία κατανομή λογαρίθμων καταμετρήσεων ολικών εντεροβακτηριακών έναντι συγκεντρώσεων ισταμίνης σε ναπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 6 – 7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά





Γράφημα 11: Τυχαία κατανομή λογαρίθμων καταμετρήσεων κολοβακτηριοειδών έναντι συγκεντρώσεων ισταμίνης σε νωπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 6 – 7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά

B.3.1.3. Είδη απομονωθέντων βακτηρίων από θερμικά κακομεταχειρισμένο τόννο

Από τους θερμικά κακομεταχειρισμένους τόννους με αυξημένη συγκέντρωση ισταμίνης, απομονώθηκαν 77 βακτηριακά στελέχη. Στον Πίνακα 24 αναγράφονται τα στελέχη που απομονώθηκαν. Τα 40 από αυτά ανήκαν στην οικογένεια των Εντεροβακτηριακών, αριθμός που αντιπροσωπεύει το 53% των απομονωθέντων στελεχών. Ο πληθυσμός των Εντεροβακτηριακών αντιπροσωπεύεται κατά κύριο λόγο από βακτήρια του είδους *Citrobacter* spp. (22%), *Enterobacter* spp. (20%), *Klebsiella* spp. (15%), *Morganella* spp. (10%) και *Escherichia* spp. (10%). Οι Σταφυλόκοκκοι που απομονώθηκαν αποτελούσαν το 21% των συνολικών στελεχών και απαρτιζόταν από τα είδη *Staphylococcus xylosum* (24% των Σταφυλόκοκκων), *S. epidermidis* (19%), *S. hominis* (19%), *S. aureus* (5%), *S. auricularis* (5%) και *S. simulans* (5%). Τα Gram αρνητικά βακτήρια που απομονώθηκαν αποτελούσαν το 21% των συνολικών απομονώσεων και αντιπροσωπεύονται από βακτήρια του είδους *P. fluorescens* (29% των Ψευδομονάδων), *P. putida* (24%) *B. ceracia* (5%), *Fl. oryzae* (5%) και *P. aeruginosa* (5%).



Πίνακας 24. Κατάλογος απομονωθέντων στελεχών

Γένος	Αριθμός απομονωθέντων στελεχών	Είδος	Αριθμός απομονωθέντων στελεχών
<i>Citrobacter</i>	9	<i>C. braaki</i>	2
		<i>C. freundii</i>	7
<i>Enterobacter</i>	8	<i>E. amnigenus</i>	2
		<i>E. aerogenes</i>	1
		<i>E. cloacae</i>	5
<i>Escherichia</i>	4	<i>E. coli</i>	4
<i>Ewingella</i>	1	<i>E. americana</i>	1
<i>Hafnia</i>	2	<i>H. alvei</i>	2
<i>Klebsiella</i>	6	<i>K. oxytoca</i>	2
		<i>K. terrigena</i>	1
		<i>K. pneumoniae pneumoniae</i>	3
<i>Morganella</i>	4	<i>M. morganii</i>	4
<i>Proteus</i>	4	<i>P. mirabilis</i>	2
		<i>P. vulgaris</i>	2
<i>Salmonella</i>	1	<i>S. Poona</i>	1
<i>Rahnella</i>	2	<i>R. aquatilis</i>	2
<i>Staphylococcus</i>	16	<i>S. aureus</i>	1
		<i>S. auricularis</i>	1
		<i>S. epidermidis</i>	4
		<i>S. hominis</i>	4
		<i>S. simulans</i>	1
		<i>S. xylosus</i>	5
<i>Burkholderia</i>	1	<i>B. cepacia</i>	1
<i>Flavimonas</i>	1	<i>F. oryzihabitans</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	12	<i>P. aeruginosa</i>	1
		<i>P. fluorescens</i>	6
		<i>P. putida</i>	5
<i>Aeromonas</i>	2	<i>A. sobriae</i>	2
<i>Enterococcus</i>	2	<i>E. faecalis</i>	1
		<i>E. hirae</i>	1
<i>Pasteurella</i>	2	<i>P. haemolytica</i>	



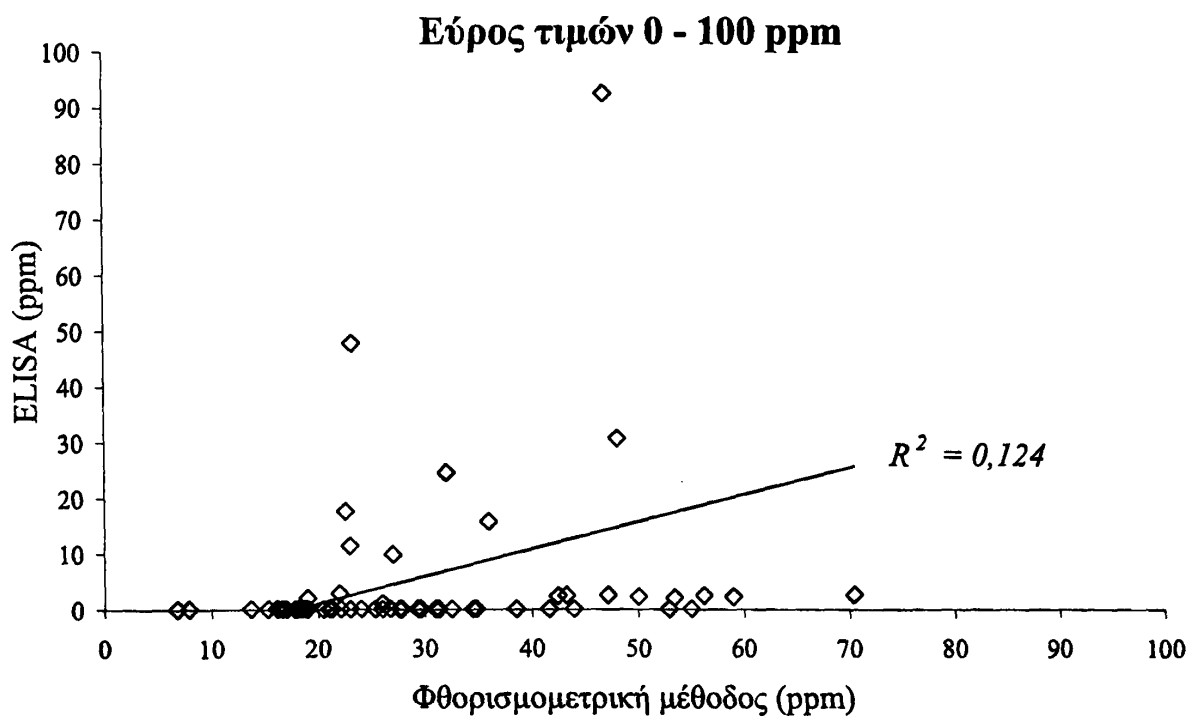
B.3.1.4. Σύγκριση φθορισμομετρικής μεθόδου με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης στα δείγματα τόννου

Τα 68 δείγματα τόννου που εξετάστηκαν με τη φθορισμομετρική μέθοδο, χωρίστηκαν ανάλογα με τη συγκέντρωση ισταμίνης που περιείχαν σε δύο κατηγορίες:

- α) δείγματα με συγκέντρωση ισταμίνης 0 – 100 ppm,
- β) δείγματα με συγκέντρωση ισταμίνης μεγαλύτερης των 100 ppm.

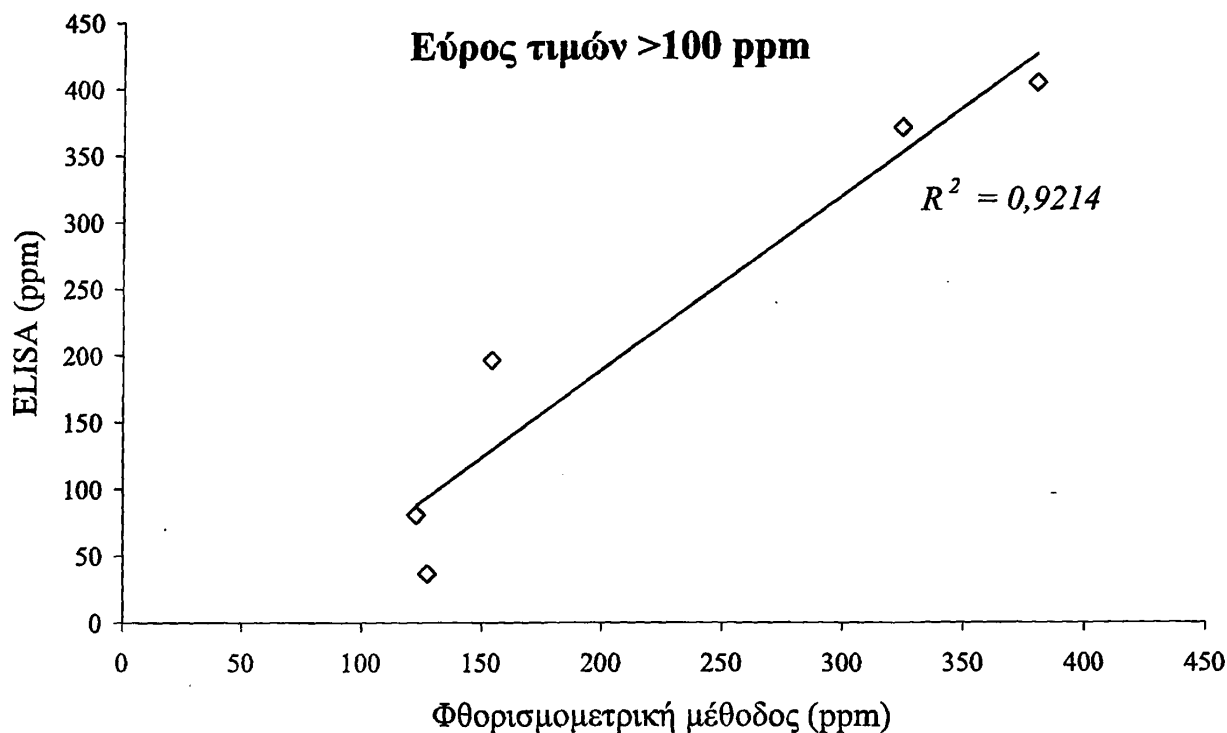
Η ανοσοενζυμική μέθοδος υποεκτίμησε τη συγκέντρωση ισταμίνης σχεδόν σε όλα τα δείγματα στα οποία η συγκέντρωση ισταμίνης κυμάνθηκε μεταξύ 0 και 100 ppm σύμφωνα με τη φθορισμομετρική μέθοδο [Γράφημα 12]. Οι τιμές που μετρήθηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές ($p < 0,05$).

Τέλος, στα δείγματα στα οποία η συγκέντρωση ισταμίνης ήταν μεγαλύτερη από 100 ppm σύμφωνα με τη φθορισμομετρική μέθοδο, η ανοσοενζυμική μέθοδος μέτρησε ορθά τη συγκέντρωση ισταμίνης [Γράφημα 13]. Οι τιμές που μετρήθηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ήταν στατιστικά όμοιες ($p > 0,05$) με αυτές της φθορισμομετρικής μεθόδου.



Γράφημα 12. Σύγκριση ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA και φθορισμομετρικής μεθόδου (εύρος τιμών 0 – 100 ppm)





Γράφημα 13. Σύγκριση ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA και φθορισμομετρικής μεθόδου (τιμές > 100 ppm)

Η ανοσοενζυμική μέθοδος υποεκτίμησε τη συγκέντρωση ισταμίνης σχεδόν σε όλα τα δείγματα στα οποία η συγκέντρωση ισταμίνης κυμάνθηκε μεταξύ 0 και 100 ppm σύμφωνα με τη φθορισμομετρική μέθοδο. Οι τιμές που μετρήθηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές ($p < 0,05$).

Τέλος, στα δείγματα στα οποία η συγκέντρωση ισταμίνης ήταν μεγαλύτερη από 100 ppm σύμφωνα με τη φθορισμομετρική μέθοδο, η ανοσοενζυμική μέθοδος μέτρησε ορθά τη συγκέντρωση ισταμίνης. Οι τιμές που μετρήθηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ήταν στατιστικά όμοιες ($p > 0,05$) με αυτές της φθορισμομετρικής μεθόδου.

B.3.1.5. Δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης ιστιδίνης, ορνιθίνης και λυσίνης των στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματα τόννου

Τα αποτελέσματα της καλλιέργειας σε Møeller decarboxylase broth παρουσιάζονται στον Πίνακα 25.



Πίνακας 25. Δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης αμινοξέων με Møeller decarboxylase broth (MD broth)

Στέλεχος	Αριθμός στελεχών	Αριθμός στελεχών που αποκαρβοξυλιώνουν το αντίστοιχο αμινοξύ σε MD broth		
		Ιστιδίνη	Ορνιθίνη	Λυσίνη
<i>Citrobacter braaki</i>	2	0	1	0
<i>Citrobacter freundii</i>	7	1	0	0
<i>Enterobacter amnigenus</i>	2	0	2	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1		1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	1	1	1
<i>Escherichia coli</i>	4	1	4	4
<i>Ewingella americana</i>	2	0	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	2	0	2	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2	2	2
<i>Klebsiella terrigena</i>	1	0	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	1	0	3
<i>Morganella morganii</i>	4	4	4	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	1	2	0
<i>Proteus vulgaris</i>	2	1	0	0
<i>Rahnella aquatilis</i>	2	0	0	0
<i>Salmonella poona</i>	1	0	1	1
<i>Staphylococcus spp.</i>	16	0	0	0
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	0	1	0
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	1	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	1	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6	1	2	6
<i>Pseudomonas putida</i>	5	0	0	1
<i>Aeromonas sobriae</i>	2	0	1	1
<i>Enterococcus faecalis</i>		0	0	0
<i>Enterococcus hirae</i>	1	1	1	1
<i>Pasteurella haemolytica</i>	2	0	0	0

Από τα στελέχη *Citrobacter spp.*, κανένα στέλεχος δεν ήταν θετικό στη δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της λυσίνης, ενώ από τα δύο στελέχη *C. braaki* μόνο το ένα ήταν θετικό στη δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της ορνιθίνης. Από τα επτά στελέχη *C. freundii* ένα ήταν θετικό στη δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της λυσίνης, όμως δεν ήταν εκείνο που παρήγαγε τη μεγαλύτερη ποσότητα ισταμίνης στο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας.

Στις δοκιμές αποκαρβοξυλίωσης αμινοξέων των στελεχών *Enterobacter cloacae*, ένα στέλεχος έδωσε και τις τρεις δοκιμές θετικές.



Όλα τα στελέχη *Escherichia coli* έδωσαν θετικές τις δοκιμές αποκαρβοξυλίωσης ορνιθίνης και λυσίνης, αλλά μόνο ένα στέλεχος έδωσε θετική και τη δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της ιστιδίνης, παρότι δεν ήταν το στέλεχος που παρήγαγε τη μεγαλύτερη ποσότητα ισταμίνης στην καλλιέργεια.

Κανένα από τα στελέχη της *Ewingella americana* δεν έδωσε θετικές τις δοκιμές αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων.

Και τα δύο στελέχη *Hafnia alvei* έδωσαν θετικές τις δοκιμές αποκαρβοξυλίωσης της ορνιθίνης και λυσίνης, ενώ κανένα στέλεχος δεν έδωσε θετική τη δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της ιστιδίνης, παρότι οι συγκεντρώσεις ισταμίνης στο υπερκείμενο υγρό ήταν σημαντικές.

Η δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της λυσίνης ήταν θετική για όλα τα στελέχη *Klebsiella* spp.. Τα στελέχη *K. oxytoca* ήταν θετικά στις δοκιμές αποκαρβοξυλίωσης ιστιδίνης και ορνιθίνης. Επίσης ένα στέλεχος *K. terrigena* έδωσε θετική τη δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης ιστιδίνης, παρότι δεν μετρήθηκε ισταμίνη στο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας.

Οι δοκιμές αποκαρβοξυλίωσης ιστιδίνης και ορνιθίνης όλων των στελεχών *Morganella morganii* ήταν θετικές.

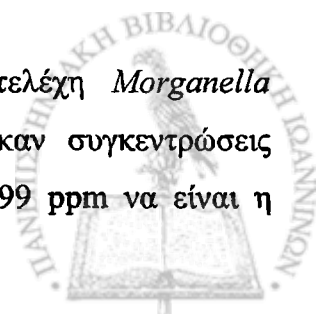
Όλα τα στελέχη *Staphylococcus* spp. έδωσαν αρνητικές τις δοκιμές αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων, παρότι στο υπερκείμενο καλλιέργειας ενός στελέχους *S. hominis* μετρήθηκε ιδιαίτερα μεγάλη συγκέντρωση ισταμίνης.

Όλα τα στελέχη *P. aeruginosa* και *P. fluorescens* ήταν θετικά για τη δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της λυσίνης, ενώ ένα στέλεχος *P. aeruginosa* και δύο στελέχη *P. fluorescens* ήταν θετικά και στη δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της ορνιθίνης. Επίσης ένα στέλεχος *P. fluorescens* ήταν θετικό στη δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της ιστιδίνης, παρότι δεν μετρήθηκε ισταμίνη στο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειάς του, ενώ ένα στέλεχος *P. putida* ήταν θετικό στη δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της λυσίνης.

Από τα στελέχη *Enterococcus* spp. το στέλεχος *E. hirae* ήταν θετικό στις δοκιμές αποκαρβοξυλίωσης και των τριών αμινοξέων Στο υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας αυτού του στελέχους ανιχνεύθηκε ιδιαίτερη μεγάλη συγκέντρωση ισταμίνης.

B.3.1.6. Μετρήσεις ισταμίνης από τις καλλιέργειες των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα δείγματα τόννου

Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ισταμίνης παρήχθησαν από στελέχη *Morganella morganii*. Συγκεκριμένα στις καλλιέργειες τριών στελεχών μετρήθηκαν συγκεντρώσεις ισταμίνης 24.499, 6875 και 6296 ppm, με τη συγκέντρωση των 24.499 ppm να είναι η



μεγαλύτερη που παράχθηκε από όλα τα εξετασθέντα στελέχη. Ιδιαίτερα αυξημένες συγκεντρώσεις ισταμίνης ανιχνεύθηκαν στις καλλιέργειες των στελεχών *Staphylococcus hominis* (στέλεχος υπ. αριθμ. 357), *Enterococcus hirae* (στέλεχος υπ. αριθμ. 049) και των δύο στελεχών *Klebsiella oxytoca* (στέλεχος υπ. αριθμ. 209) και *Klebsiella oxytoca* (στέλεχος υπ. αριθμ. 421) (3050, 2404, 2156 και 2149 ppm αντίστοιχα). Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης που ανιχνεύτηκαν στα υπερκείμενα των καλλιεργειών σε Møeller broth μετά από 3 ημέρες επώασης αναγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 26.

Οι καλλιέργειες Εντεροβακτηριακών είχαν το μεγαλύτερο αριθμό θετικών για παραγωγή ισταμίνης στελεχών.

Στις καλλιέργειες *Citrobacter* spp. ανιχνεύτηκε κατά μέσο όρο συγκέντρωση ισταμίνης $12,8 \pm 7,4$ ppm, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (42 ppm) να ανιχνεύεται στο στέλεχος *Citrobacter freundii* υπ. αριθμ. 193.

Στις καλλιέργειες των *Enterobacter* spp. δεν ανιχνεύτηκε ισταμίνη στις καλλιέργειες των ειδών *E. cloacae* και *E. amnigenus* ενώ ανιχνεύτηκαν 60 ppm ισταμίνης στην καλλιέργεια του στελέχους *E. aerogenes*.

Στις καλλιέργειες στελεχών *Escherichia coli* ανιχνεύτηκαν κατά μέσο όρο $9,5 \pm 5,5$ ppm ισταμίνης, ενώ στις καλλιέργειες *Hafnia alvei* η συγκέντρωση ισταμίνης κατά μέσο όρο ήταν $71 \pm 3,8$ ppm.

Στις καλλιέργειες του γένους *Klebsiella* spp. ανιχνεύτηκε ισταμίνη στις καλλιέργειες του είδους *K. oxytoca* ($2153 \pm 2,8$ ppm), ενώ δεν ανιχνεύτηκε στις καλλιέργειες του είδους *K. pneumoniae*.

Στις καλλιέργειες των στελεχών *Morganella morganii* ανιχνεύτηκαν ιδιαίτερα αυξημένες συγκεντρώσεις ισταμίνης, με εξαίρεση της καλλιέργειας ενός στελέχους (στέλεχος *M. morganii* υπ. αριθμ. 184), που η συγκέντρωση ισταμίνης ήταν 20 ppm.

Μεταξύ των στελεχών *Proteus* spp. που εξετάστηκαν, οι *P. mirabilis* παράγαγαν κατά μέσο όρο $9 \pm 2,4$ ppm ισταμίνης, ενώ οι *P. vulgaris* δεν παράγαγαν ισταμίνη.

Τέλος στην καλλιέργεια ενός στελέχους *Salmonella roosa* ανιχνεύτηκαν 14 ppm ισταμίνης.

Στις καλλιέργειες στελεχών *S. aureus*, *S. auricularis* και *S. epidermidis* δεν ανιχνεύτηκε ισταμίνη. Στις καλλιέργειες των περισσότερων στελεχών *S. hominis* παράχθησαν πολύ μικρές ποσότητες ισταμίνης ($0,31 \pm 0,2$ ppm), με εξαίρεση την καλλιέργεια ενός στελέχους, όπου η συγκέντρωση ισταμίνης ήταν 3050 ppm.

Στις καλλιέργειες των Ψευδομονάδων που εξετάστηκαν, ανιχνεύτηκαν πολύ μικρές ποσότητες ισταμίνης ($0,62 \pm 0,3$ ppm).



Πίνακας 26. Συγκέντρωση ισταμίνης σε υπερκείμενα καλλιεργειών σε Møeller
decarboxylase broth

Βακτήρια	Συγκέντρωση ισταμίνης (ppm)	Βακτήρια	Συγκέντρωση ισταμίνης (ppm)
Εντεροβακτηριακά		Σταφυλόκοκκοι	
<i>Citrobacter braaki</i> 8	13	<i>Staphylococcus aureus</i> 071	0
<i>C. braaki</i> 48	4	<i>S. auricularis</i> 376	0
<i>C. freundii</i> 193	42	<i>S. epidermidis</i> 107	0
<i>C. freundii</i> 205	19	<i>S. epidermidis</i> 108	0
<i>C. freundii</i> 364	8	<i>S. epidermidis</i> 375	0
<i>C. freundii</i> 201	6	<i>S. epidermidis</i> 378	0
<i>C. freundii</i> 173	5	<i>S. hominis</i> 357	3050
<i>C. freundii</i> 354	2	<i>S. hominis</i> 99	1
<i>C. freundii</i> 225	2	<i>S. hominis</i> 106	0
<i>Enterobacter amnigenus</i> 416	0	<i>S. hominis</i> 413	0
<i>E. amnigenus</i> 422	0	<i>S. simulans</i> 243	1
<i>E. aerogenes</i> 214	60	<i>S. xylosus</i> 164	1
<i>E. cloacae</i> 094	2	<i>S. xylosus</i> 389	0
<i>E. cloacae</i> 199	0	<i>S. xylosus</i> 391	0
<i>E. cloacae</i> 418	0	<i>S. xylosus</i> 388	0
<i>E. cloacae</i> 206	0	<i>S. xylosus</i> 407	0
<i>E. cloacae</i> 383	0	Gram αρνητικά βακτήρια	
<i>Escherichia coli</i> 287	20	<i>Burkholderia cepacia</i> 380	0
<i>E. coli</i> 132	18	<i>Flavimonas oryzihabitans</i> 030	0
<i>E. coli</i> 254	3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 245	1
<i>E. coli</i> 322	2	<i>P. fluorescens</i> 302	1
<i>Ewingella americana</i> 197	1	<i>P. fluorescens</i> 365	0
<i>Hafnia alvei</i> 244	76	<i>P. fluorescens</i> 367	0
<i>H. alvei</i> 427	66	<i>P. fluorescens</i> 369	0
<i>Klebsiella oxytoca</i> 209	2156	<i>P. fluorescens</i> 366	0
<i>K. oxytoca</i> 421	2149	<i>P. fluorescens</i> 368	0
<i>K. terrigena</i> 428	0	<i>P. putida</i> 024	2
<i>K. pneumoniae</i> 130	0	<i>P. putida</i> 032	1
<i>K. pneumoniae</i> 078	0	<i>P. putida</i> 384	0
<i>K. pneumoniae</i> 344	0	<i>P. putida</i> 034	0
<i>Morganella morganii</i> 138	24499	<i>P. putida</i> 041	0
<i>M. morganii</i> 030	6875	<i>Aeromonas sobriae</i> 269	7
<i>M. morganii</i> 156	6296	<i>A. caviae</i> 196	0
<i>M. morganii</i> 184	20	Άλλα βακτήρια	
<i>Proteus mirabilis</i> 054	11	<i>Enterococcus faecalis</i> 075	15
<i>P. mirabilis</i> 286	8	<i>E. hirae</i> 049	2404
<i>P. vulgaris</i> 381	0	<i>Pasteurella haemolytica</i> 111	0
<i>P. vulgaris</i> 140	0	<i>P. haemolytica</i> 112	0
<i>Rahnella aquatilis</i> 198	0		
<i>R. aquatilis</i> 211	0		
<i>Salmonella poona</i> 040	14		

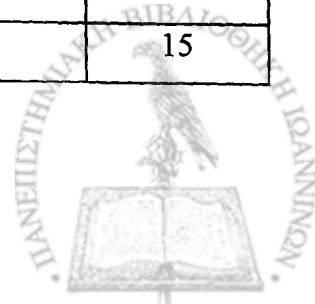
Τέλος στις καλλιέργειες των *Enterococcus* spp. ανιχνεύτηκαν συγκεντρώσεις ισταμίνης, που στην περίπτωση του *E. faecalis* ήταν 15 ppm, ενώ στην καλλιέργεια του *E. hirae* έφτανε τα 2404 ppm.

Σύμφωνα με την κατάταξη που πρότειναν οι Behling και Taylor (1982) τα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια χωρίζονται σε αυτά που παράγουν μεγάλα ποσά ισταμίνης (>1000 ppm) εντός εικοσιτεσσάρων ωρών και σε αυτά που παράγουν μικρότερες ποσότητες ισταμίνης (<1000 ppm) σε μεγαλύτερα (> 48 h) χρονικά διαστήματα σε TFIB broth. Με βάση αυτή την κατάταξη τα βακτήρια που παρήγαγαν συγκέντρωση ισταμίνης μεγαλύτερης από 1000 ppm στο Møeller decarboxylase broth χαρακτηρίστηκαν ως ταχείς παραγωγείς ισταμίνης και ως βραδείς παραγωγείς ισταμίνης τα βακτήρια που παρήγαγαν συγκέντρωση ισταμίνης μικρότερη από 1000 ppm. Τα βακτηριακά στελέχη που ανήκαν σε αυτές τις κατηγορίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 27.



Πίνακας 27. Ταχείς και βραδείς παραγωγείς ισταμίνης

Ταχείς παραγωγείς ισταμίνης		Βραδείς παραγωγείς ισταμίνης	
Στέλεχος	Συγκέντρωση ισταμίνης (ppm)	Στέλεχος	Συγκέντρωση ισταμίνης (ppm)
<i>Klebsiella oxytoca</i> στέλεχος 209	2156	<i>Citrobacter braaki</i> 8	13
<i>K. oxytoca</i> στέλεχος 421	2149	<i>C. braaki</i> 48	4
<i>Morganella morganii</i> 138	24499	<i>C. freundii</i> 173	5
<i>M. morganii</i> 030	6875	<i>C. freundii</i> 193	42
<i>M. morganii</i> 156	6296	<i>C. freundii</i> 201	6
<i>Staphylococcus hominis</i> 357	3050	<i>C. freundii</i> 205	19
<i>Enterococcus hirae</i> 049	2404	<i>C. freundii</i> 225	2
		<i>C. freundii</i> 354	2
		<i>C. freundii</i> 364	8
		<i>Enterobacter aerogenes</i> 214	60
		<i>E. cloacae</i> 094	2
		<i>Escherichia coli</i> 322	2
		<i>E. coli</i> 254	3
		<i>E. coli</i> 132	18
		<i>E. coli</i> 287	20
		<i>H. alvei</i> 427	66
		<i>H. alvei</i> 244	76
		<i>M. morganii</i> 184	20
		<i>P. mirabilis</i> 286	8
		<i>P. mirabilis</i> 054	11
		<i>S. poona</i> 040	14
		<i>A. sobriae</i> 269	7
		<i>E. faecalis</i> 075	15



B.3.1.7. Μελέτη της ικανότητας απομόνωσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων σε εκλεκτικά υποστρώματα

Τα αποτελέσματα της ικανότητας ανίχνευσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων των έξι εκλεκτικών υποστρωμάτων που μελετήθηκαν παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 28 και αναλυτικά στον Πίνακα 29.

Πίνακας 28. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των καλλιεργειών βακτηριακών στελεχών στα εκλεκτικά υποστρώματα Niven, Modified Niven και Møeller decarboxylase, που δείχνουν την ικανότητα απομόνωσης των τριών υποστρωμάτων

	Στερεό υπόστρωμα			Υγρό υπόστρωμα		
	Niven (%)	M-Niven (%)	Møeller (%)	Niven (%)	M-Niven (%)	Møeller (%)
Ταχείς παραγωγείς ισταμίνης						
Θετικά	71	57	57	86	29	86
Αρνητικά	14	14	29	14	71	14
Θετικά σε υπόστρωμα χωρίς ιστιδίνη	14	29	14	0	0	0
Βραδείς παραγωγείς ισταμίνης						
Θετικά	71	38	42	29	17	21
Αρνητικά	17	25	46	71	83	79
Θετικά σε υπόστρωμα χωρίς ιστιδίνη	8	33	4	0	0	0
Βακτήρια που δεν παράγουν ισταμίνη						
Θετικά	33	20	28	11	0	7
Αρνητικά	54	35	63	85	96	91
Θετικά σε υπόστρωμα χωρίς ιστιδίνη	11	43	7	0	0	0



Πίνακας 29. Αναλυτικά αποτελέσματα της ικανότητας απομόνωσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων των Niven, m – Niven και Møeller decarboxylase στερεών και υγρών εκλεκτικών υποστρωμάτων*

	Στερεό υπόστρωμα			Υγρό υπόστρωμα		
	Niven	Modified Niven	Møeller	Niven	Modified Niven	Møeller
Γαχείς παραγωγείς ισταμίνης						
<i>K. oxytoca</i> στέλεχος 209	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό
<i>K. oxytoca</i> στέλεχος 421	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Θετικό
<i>M. morgani</i> στέλεχος 138	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Θετικό
<i>M. morgani</i> στέλεχος 30	Θετικό	Θετικό *	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Θετικό
<i>M. morgani</i> στέλεχος 156	Αρνητικό	Αρνητικό	Αμφίβολο	Θετικό	Αρνητικό	Θετικό
<i>S. hominis</i> στέλεχος 357	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>E. hirae</i> στέλεχος 049	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό
Βραδείς παραγωγείς ισταμίνης						
<i>C. braaki</i> στέλεχος 8	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό
<i>C. braaki</i> στέλεχος 48	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>C. freundii</i> στέλεχος 173	Θετικό	Θετικό *	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>C. freundii</i> στέλεχος 193	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Θετικό	Θετικό
<i>C. freundii</i> στέλεχος 201	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό
<i>C. freundii</i> στέλεχος 205	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό
<i>C. freundii</i> στέλεχος 225	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>C. freundii</i> στέλεχος 354	Θετικό	Θετικό *	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>C. freundii</i> στέλεχος 364	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>E. aerogenes</i> στέλεχος 214	Θετικό	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>E. cloacae</i> στέλεχος 94	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Θετικό
<i>E. coli</i> στέλεχος 322	Θετικό	Θετικό *	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Θετικό

Πίνακας 29. (συνέχεια)

		Στερό υδρόστρωμα			Υγρό υδρόστρωμα		
		Niven	Modified Niven	Møeller	Niven	Modified Niven	Møeller
Βραδείς παραγωγείς ισταμίνης (συνέχεια)							
<i>E. coli</i> στέλεχος 254	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>E. coli</i> στέλεχος 132	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>E. coli</i> στέλεχος 287	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>H. alvei</i> στέλεχος 427	Θετικό	Θετικό *	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>H. alvei</i> στέλεχος 244	Θετικό	Θετικό *	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>M. Morganii</i> στέλεχος 184	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Θετικό	Αρνητικό	Θετικό
<i>P. mirabilis</i> στέλεχος 286	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αμφίβολο	Αρνητικό	Αρνητικό	Θετικό
<i>P. mirabilis</i> στέλεχος 54	Αμφίβολο	Αρνητικό	Αρνητικό	Αμφίβολο	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. roosa</i> στέλεχος 40	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. putida</i> στέλεχος 24	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>A. sobria</i> στέλεχος 269	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>E. faecalis</i> στέλεχος 075	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
Βακτήρια που δεν παράγουν ισταμίνη							
<i>E. amnigenus</i> στέλεχος 416	Αρνητικό	Θετικό *	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>E. amnigenus</i> στέλεχος 422	Θετικό	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>E. cloacae</i> στέλεχος 199	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>E. cloacae</i> στέλεχος 206	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό *	Αρνητικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>E. cloacae</i> στέλεχος 383	Θετικό	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>E. cloacae</i> στέλεχος 418	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>E. americana</i> στέλεχος 197	Θετικό	Θετικό *	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>K. terrigena</i> στέλεχος 428	Θετικό	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>K. pneumoniae</i> στέλεχος 130	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό

Πίνακας 29. (συνέχεια)

	Στερεό υπόστρωμα				Υγρό υπόστρωμα			
	Niven		Møeller		Niven		Møeller	
	Modified Niven	Møeller	Modified Niven	Møeller	Modified Niven	Møeller	Modified Niven	
Βακτήρια που δεν παράγουν ισταμίνη (συνέχεια)								
<i>K. pneumoniae</i> στέλεχος 78	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Θετικό
<i>K. pneumoniae</i> στέλεχος 344	Θετικό	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. vulgaris</i> στέλεχος 381	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό *	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Θετικό
<i>P. vulgaris</i> στέλεχος 140	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>R. aquatilis</i> στέλεχος 198	Θετικό	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>R. aquatilis</i> στέλεχος 211	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. aureus</i> στέλεχος 71	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. auricularis</i> στέλεχος 376	Πτωχή ανάπτυξη	Πτωχή ανάπτυξη	Πτωχή ανάπτυξη	Πτωχή ανάπτυξη	Πτωχή ανάπτυξη	Πτωχή ανάπτυξη	Πτωχή ανάπτυξη	Πτωχή ανάπτυξη
<i>S. epidermidis</i> στέλεχος 107	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. epidermidis</i> στέλεχος 108	Αρνητικό	Θετικό *	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. epidermidis</i> στέλεχος 375	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. epidermidis</i> στέλεχος 378	Αρνητικό	Θετικό *	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. hominis</i> στέλεχος 99	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. hominis</i> στέλεχος 106	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. hominis</i> στέλεχος 413	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. simulans</i> στέλεχος 243	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. xyloso</i> στέλεχος 388	Θετικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. xyloso</i> στέλεχος 389	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. xyloso</i> στέλεχος 391	Θετικό	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. xyloso</i> στέλεχος 407	Αρνητικό	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>S. xyloso</i> στέλεχος 164	Αρνητικό	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό

Πίνακας 29. (συνέχεια)

	Στερεό υπόστρωμα			Υγρό υπόστρωμα		
	Niven	Modified Niven	Møeller	Niven	Modified Niven	Møeller
Βακτήρια που δεν παράγουν ισταμίνη (συνέχεια)						
<i>B. ceracia</i> στέλεχος 380	Αρνητικό	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>F. oryzihabitans</i> στέλεχος 30	Αρνητικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. aeruginosa</i> στέλεχος 245	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. fluorescens</i> στέλεχος 302	Θετικό	Θετικό *	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. fluorescens</i> στέλεχος 365	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. fluorescens</i> στέλεχος 366	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. fluorescens</i> στέλεχος 367	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. fluorescens</i> στέλεχος 368	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. fluorescens</i> στέλεχος 369	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Θετικό
<i>P. putida</i> στέλεχος 32	Αρνητικό	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. putida</i> στέλεχος 34	Θετικό *	Θετικό *	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. putida</i> στέλεχος 41	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. putida</i> στέλεχος 384	Αρνητικό	Αρνητικό	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>A. caviae</i> στέλεχος 196	Θετικό	Θετικό *	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. haemolytica</i> στέλεχος 111	Αρνητικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό
<i>P. haemolytica</i> στέλεχος 112	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό

* Υπόστρωμα χωρίς ιστιδίνη

B.3.1.8. Μελέτη της ικανότητας ανίχνευσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων σε υπόστρωμα πτωχό σε θρεπτικές ουσίες

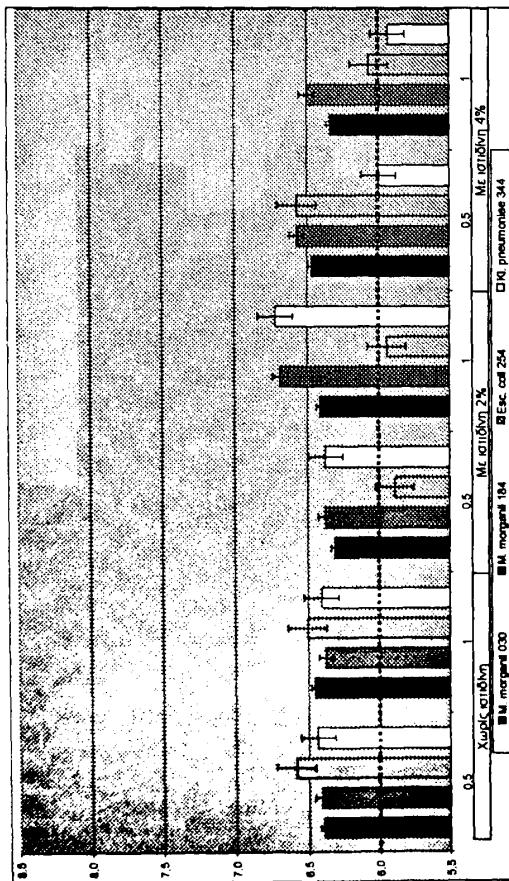
Οι τιμές pH που μετρήθηκαν μετά από 72 h επώασης των στελεχών *Morganella morganii* 030 (ταχύς παραγωγός ισταμίνης), *Morganella morganii* 184 (βραδύς παραγωγός ισταμίνης), *Escherichia coli* 254 (βραδύς παραγωγός ισταμίνης) και *Klebsiella pneumoniae* 344 (βακτήριο που δεν παράγει ισταμίνη) αναγράφονται στους Πίνακες 30, 31, 32 και 33 και στα ενσωματωμένα γραφήματα.

Οι διαφορές pH που μετρήθηκαν μετά την επώαση των καλλιεργειών ήταν γενικά μικρές. Συγκεκριμένα για τα υποστρώματα με pH=6,00 (υποστρώματα 1 έως 8) οι τιμές pH κυμάνθηκαν μεταξύ 5,9 και 7,1 και για τα υποστρώματα με pH=7,00 (υποστρώματα 9 έως 17) κυμάνθηκαν μεταξύ 6,2 και 8,1. Ειδικότερα στο υπόστρωμα 9 που περιείχε τρυπτόνη 0,1%, η ανάπτυξη των βακτηρίων ήταν μέτρια, παρουσιάζοντας μικρή θόλωση συγκριτικά με τα άλλα υποστρώματα.

Μεταξύ των υποστρωμάτων που περιείχαν ισταμίνη και των υποστρωμάτων – μαρτύρων, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) διαφορά στις καλλιέργειες της *Morganella morganii* 030 στα υποστρώματα 7 και 13. Στις καλλιέργειες της *Morganella morganii* διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα υποστρώματα 2, 6, 10 και 13.

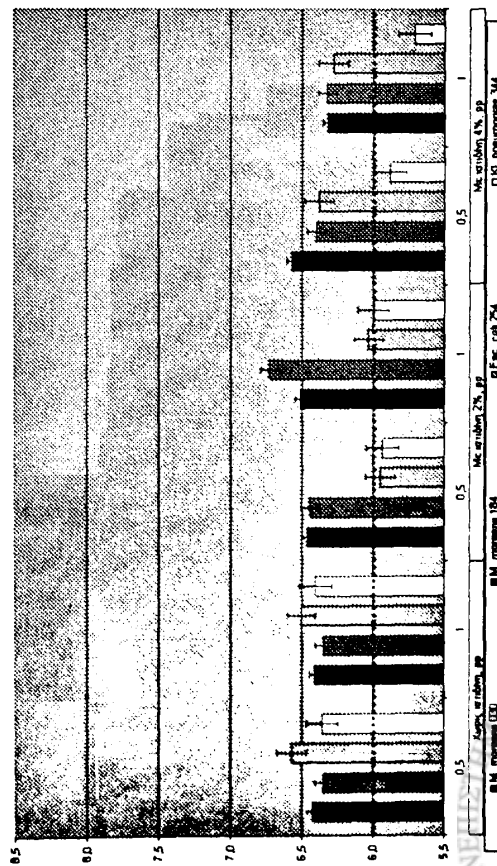
Στις καλλιέργειες της *Escherichia coli* 254 διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο υπόστρωμα 13. Κοινό σημείο των συγκεκριμένων ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων ήταν η στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές pH μεταξύ του υποστρώματος 13 (τρυπτόνη 1%, ιστιδίνη 4%, χωρίς πυριδοξάλη, pH=6,50) και του αντίστοιχου υποστρώματος – μάρτυρα. Η στατιστική ανάλυση των τιμών pH στο υπόστρωμα 13 των τριών βακτηρίων έναντι των τιμών pH στο ίδιο υπόστρωμα της *Klebsiella pneumoniae* 344 (βακτήριο που δεν παράγει ισταμίνη) έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) μεταξύ αυτών.





	Χωρίς ιστιδίνη		Με ιστιδίνη 2%		Με ιστιδίνη 4%	
	Τρυπτόνη %	Με ιστιδίνη %	Τρυπτόνη %	Με ιστιδίνη %	Τρυπτόνη %	Με ιστιδίνη %
<i>M. morganii</i> 030	0,5	1	0,5	1	0,5	1
	6,4	6,5	6,3	6,4	6,5	6,3
<i>M. morganii</i> 184	6,4	6,4	6,4	6,7	6,6	6,5
	6,6	6,5	5,9	5,9	6,6	6,1
<i>E. coli</i> 254	6,4	6,4	6,4	6,7	6,0	5,9
<i>K. pneumoniae</i> 344	6,4	6,4	6,4	6,7	6,0	5,9

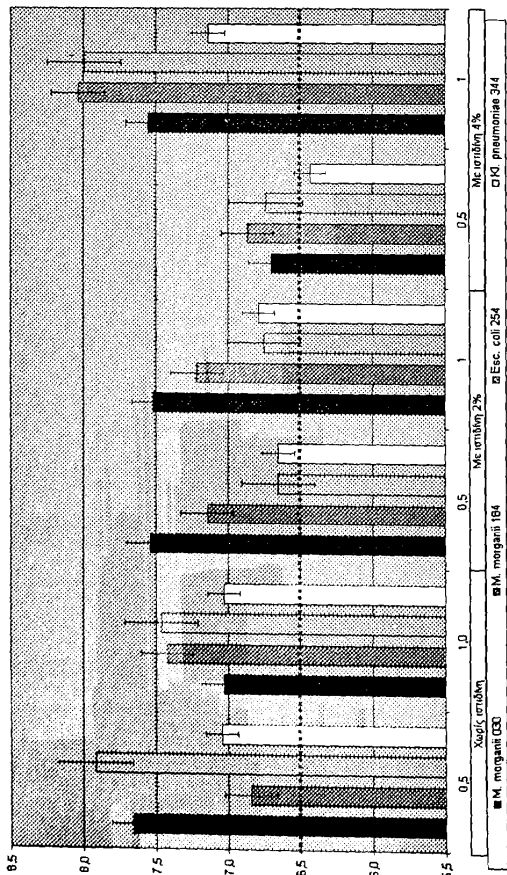
Πίνακας 31. Γραφική παράσταση και μέσες τιμές pH υλοστρωμάτων 5-8 και μαρτύρων μετά από 72 h επώασης (pH=6,00, με πυριδοξάλη)



	Χωρίς ιστιδίνη & PP		Με ιστιδίνη 2% & PP		Με ιστιδίνη 4% & PP	
	Τρυπτόνη %	Με ιστιδίνη %	Τρυπτόνη %	Με ιστιδίνη %	Τρυπτόνη %	Με ιστιδίνη %
<i>M. morganii</i> 030	0,5	1	0,5	1	0,5	1
	6,4	6,4	6,5	6,5	6,6	6,3
<i>M. morganii</i> 184	6,4	6,4	6,4	6,7	6,4	6,3
	6,6	6,5	6,0	6,0	6,4	6,3
<i>E. coli</i> 254	6,4	6,4	6,4	6,7	6,4	6,3
<i>K. pneumoniae</i> 344	6,4	6,4	6,4	6,7	6,0	5,9

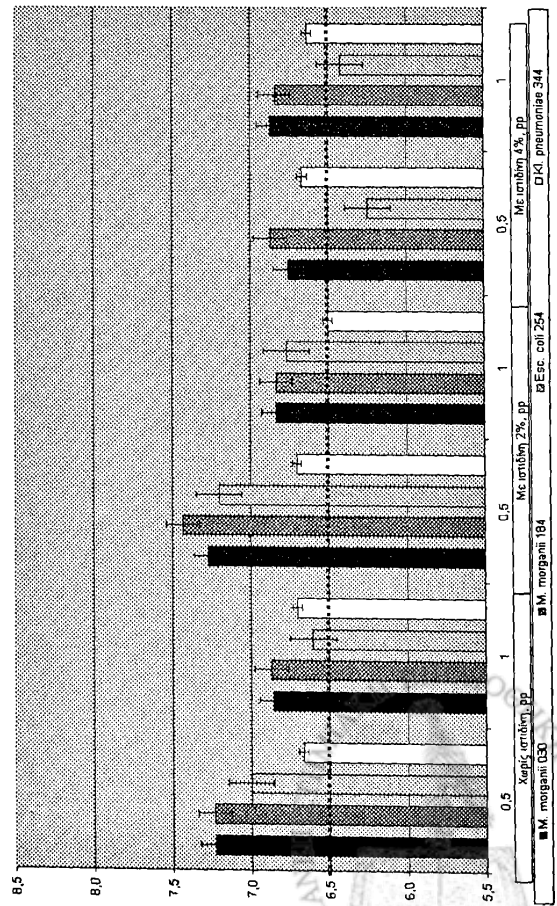
Πίνακας 32. Γραφική παράσταση & μέσες τιμές pH υποστρωμάτων 9-13 και μαρτύρων μετά από 72 h επώασης (pH=6,50)

	Χωρίς ιστιδίνη pH=6,5		Με ιστιδίνη 2% pH=6,5		Με ιστιδίνη 4% pH=6,5				
	Τρυπτόνη %	Τρυπτόνη %	Τρυπτόνη %	Τρυπτόνη %	Τρυπτόνη %	Τρυπτόνη %			
<i>M. morganii</i> 030	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
	7,5	7,7	7,0	6,8	7,5	7,5	6,7	6,7	7,6
<i>M. morganii</i> 184	7,2	6,8	7,4	6,7	7,1	7,2	6,9	8,0	
<i>E. coli</i> 254	7,3	7,0	7,0	6,7	6,7	6,8	6,4	7,9	
<i>K. pneumoniae</i> 344	7,3	7,0	7,0	6,7	6,7	6,8	6,4	7,1	



Πίνακας 33. Γραφική παράσταση και μέσες τιμές pH υποστρωμάτων 15-18 και μαρτύρων μετά από 72 h επώασης (pH=6,50 με πυριδοξάλη)

	Χωρίς ιστιδίνη & PP		Με ιστιδίνη 2% & PP		Με ιστιδίνη 4% & PP	
	Τρυπτόνη %	Τρυπτόνη %	Τρυπτόνη %	Τρυπτόνη %	Τρυπτόνη %	Τρυπτόνη %
<i>M. morganii</i> 030	0,5	1	0,5	1	0,5	1
	7,2	6,9	7,3	6,8	6,8	6,9
<i>M. morganii</i> 184	7,2	6,9	7,4	6,8	6,9	6,8
<i>E. coli</i> 254	7,0	6,6	7,2	6,8	6,2	6,4
<i>K. pneumoniae</i> 344	6,7	6,7	6,7	6,5	6,7	6,6



B.3.2. Αποτελέσματα εργαστηριακής διερεύνησης του αιτίου της επιδημίας διαρροϊκής δηλητηρίασης εξαιτίας κατανάλωσης μυδιών στη Θεσσαλονίκη

Τοξίνες του διαρροϊκού συνδρόμου των δίθυρων ανιχνεύθηκαν σε τέσσερα από τα δέκα δείγματα μυδιών που εξετάσθηκαν [Πίνακας 34]. Θετικά βρέθηκαν τα τρία από τα εννέα δείγματα μυδιών που αλιεύτηκαν από την περιοχή της Χαλάστρας. Τα δύο θετικά δείγματα είχαν συλλεχθεί κατά τη διάρκεια της επιδημικής έξαρσης διαρροϊκής δηλητηρίασης από κατανάλωση μυδιών που καταγράφηκε τον Ιανουαρίου του 2000 στη Θεσσαλονίκη. Στα δύο αυτά θετικά δείγματα ο μέσος χρόνος θανάτου των ποντικών ήταν 85 min μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση. Το τρίτο θετικό δείγμα από την περιοχή της Χαλάστρας συλλέχθηκε από ιχθυοπωλείο της Θεσσαλονίκης 15 μήνες μετά την επιδημική έξαρση. Στο δείγμα αυτό ο μέσος χρόνος θανάτου των ποντικών ήταν 5 h. Εκείνη τη χρονική περίοδο δεν είχαν αναφερθεί περιστατικά διαρροϊκής δηλητηρίασης από δίθυρα ή παρόμοιες γαστρεντερικές νόσοι.

Το τέταρτο θετικό δείγμα προερχόταν από τον Αμβρακικό κόλπο, από την περιοχή του οποίου δεν έχουν αναφερθεί περιστατικά διαρροϊκής δηλητηρίασης από δίθυρα. Τα ποντίκια στα οποία εγχύθηκε εκχύλισμα αυτού του δείγματος, εκτός από τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της τοξίκωσης από διαρροϊκές τοξίνες, εμφάνισαν σπασμούς και υπερευαισθησία 2 ώρες πριν το θάνατό τους (μέσος χρόνος θανάτου 9 h). Τα συμπτώματα των ποντικών μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση εκχυλίσματος μυδιών αναγράφονται στον Πίνακα 34.



Πίνακας 34. Ημερομηνία δειγματοληψίας και προέλευση δειγμάτων. Συμπτώματα και χρόνος θανάτου ποντικών

Ημερομηνία δειγματοληψίας	Προέλευση	Συμπτώματα	Μέσος χρόνος επίβιωσης (υγρά / ποντίκια πειραματικής ομάδας)		Αποτέλεσμα
15/1/2000	Θερμαϊκός (Επιδημική έξαρση)	Απάθεια, αδυναμία, δυσκινησία, κοπιώδης αναπνοή, επιθανάτιο σπασμοί, θάνατος	1 h 25 min	(3/3)	Θετικό
19/1/2000	Θερμαϊκός (Επιδημική έξαρση)	Απάθεια, αδυναμία, δυσκινησία, κοπιώδης αναπνοή, επιθανάτιο σπασμοί, θάνατος	1 h 30 min	(3/3)	Θετικό
15/4/2000	Θερμαϊκός	Απουσία συμπτωμάτων	> 48 h	(0/3)	Αρνητικό
6/12/2000	Θερμαϊκός	Απουσία συμπτωμάτων	> 48 h	(0/3)	Αρνητικό
19/1/2001	Αμβρακικός	Απάθεια, αδυναμία, δυσκινησία, κοπιώδης αναπνοή, υπερευαίσθησία, επιθανάτιο σπασμοί, θάνατος	9 h	(3/3)	Θετικό
22/2/2001	Θερμαϊκός	Απουσία συμπτωμάτων	> 48 h	(0/3)	Αρνητικό
23/3/2001	Θερμαϊκός	Απάθεια, αδυναμία, δυσκινησία, κοπιώδης αναπνοή, θάνατος	5 h	(3/3)	Θετικό
10/9/2001	Θερμαϊκός	Απουσία συμπτωμάτων	> 48 h	(0/3)	Αρνητικό
20/12/2001	Θερμαϊκός	Απουσία συμπτωμάτων	> 48 h	(0/3)	Αρνητικό
15/4/2002	Θερμαϊκός	Απουσία συμπτωμάτων	> 48 h	(0/3)	Αρνητικό

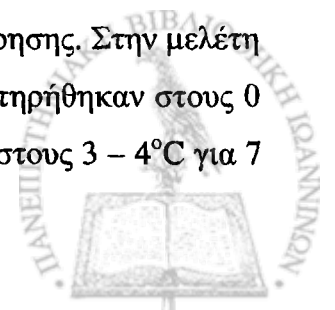
B.4. Συζήτηση

Τα ψάρια, όπως και τα άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, ψύχονται και αποψύχονται αρκετές φορές στους χώρους των μαγειρείων μέχρις ότου σερβιριστούν. Μάλιστα όταν τα ψάρια είναι μεγάλα (π.χ. τόννος, παλαμίδα, ξιφίας κτλ) συνήθως χρησιμοποιούνται μικρά τεμάχια τους καθημερινά για την παρασκευή των γευμάτων, με αποτέλεσμα την καθημερινή έκθεση τους για μικρά ή μεγάλα χρονικά διαστήματα στη θερμοκρασία περιβάλλοντος του μαγειρείου (Becker και συν., 2001). Λόγω αυτών των θερμικών κακομεταχειρίσεων υπάρχει αυξημένη πιθανότητα παραγωγής ισταμίνης και πρόκλησης τοξίκωσης από ισταμίνη στους καταναλωτές. Εξάλλου, σύμφωνα με την υπάρχουσα διεθνή βιβλιογραφία, τα περισσότερα κρούσματα δηλητηρίασης από ισταμίνη οφείλονται σε γεύματα ψαριών που καταναλώθηκαν σε εστιατόρια (Taylor και Eittenmiller, 1986· Taylor και Eittenmiller, 1986· Scoging, 1998· Lehane και Olley, 2000).

Συγκεκριμένα το CDC αναφέρει ότι στο χρονικό διάστημα 1998 – 2002 κατεγράφησαν στις Η.Π.Α. 82 επιδημικές εξάρσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη, κατά τις οποίες νόσησαν 309 άτομα λόγω κατανάλωσης ψαριών σε εστιατόρια (CDC, 2003a – d· CDC, 2004). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επιδημική έξαρση στην Πενσυλβάνια των Η.Π.Α. κατά την οποία νόσησαν 4 άτομα λόγω κατανάλωσης τοξικού κιτρινόπτερου τόννου (Maher και συν., 2000), για την οποία το CDC αποφάνθηκε ότι οφείλονταν σε σφάλμα του εστιατορίου κατά την παρασκευή του γεύματος τόννου (Maher και συν. 2000). Τέλος οι Becker και συν. (2001) αναφέρουν 5 επιδημικές εξάρσεις μεταξύ Ιουλίου του 1998 και Φεβρουάριου του 1999 κατά τις οποίες νόσησαν 22 άτομα στην περιοχή της Βόρειας Καρολίνας των Η.Π.Α. λόγω κατανάλωσης γεύματος τόννου σε εστιατόρια. Στις 19 από τις 22 περιπτώσεις ο τόννος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του γεύματος είχε ψυχθεί και αποψυχθεί περισσότερες από μία φορές πριν την κατανάλωσή του.

Η παραγωγή ισταμίνης σε δείγματα ψαριών υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασιακής μεταχείρισης έχουν αποτελέσει αντικείμενο έρευνας από την δεκαετία του '80. Όμως οι αναφορές σχετικά με μελέτες σε δείγματα τόννου είναι λιγοστές.

Οι Frank και Yoshinaga (1987) αναφέρουν ότι σε νωπή παλαμίδα (ψάρι συγγενές του τόννου) που συντηρήθηκε στους -1°C , $4,4^{\circ}\text{C}$ και 10°C , οι συγκεντρώσεις ισταμίνης ήταν 3,8 ppm, 5,6 ppm and 169 ppm αντίστοιχα, μετά από 12 έως 14 ημέρες συντήρησης. Στην μελέτη μας σε παρόμοιες ομάδες συντήρησης (νωποί τόννοι – μάρτυρες που συντηρήθηκαν στους $0 - 2^{\circ}\text{C}$ για 12 ημέρες, αποψυγμένοι τόννοι – μάρτυρες που συντηρήθηκαν στους $3 - 4^{\circ}\text{C}$ για 7



ημέρες και νωποί τόννοι – μάρτυρες που συντηρήθηκαν στους 6 – 7°C για 12 ημέρες αντίστοιχα), οι συγκεντρώσεις ισταμίνης ήταν μεγαλύτερες (33,5 ppm, 30 ppm και 350 ppm αντίστοιχα). Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η αρχική συγκέντρωση ισταμίνης των ψαριών που χρησιμοποίησαν οι Frank και Yoshinaga ήταν σαφώς μικρότερη (περιείχαν περίπου 1,1 ppm ισταμίνης αρχικά) από τη συγκέντρωση ισταμίνης των δειγμάτων μας (περιείχαν 1 – 47,1 ppm ισταμίνης αρχικά).

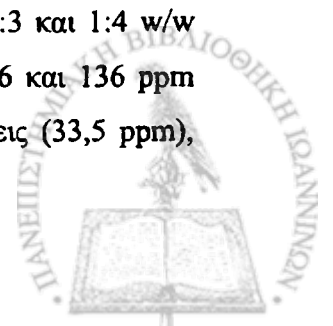
Οι López-Sabater και συν. (1996) ανίχνευσαν τοξικές συγκεντρώσεις ισταμίνης (1410 – 1500 ppm) σε μεγάλα κομμάτια νωπού τόννου από την τέταρτη ημέρα συντήρησης στους 8°C, οι οποίες υπερέβησαν τα 2500 ppm μετά την έκτη ημέρα συντήρησης στους 8°C. Στον πειραματισμό μας η συγκέντρωση ισταμίνης των νωπών ολόκληρων τόννων – μαρτύρων κατά την όγδοη ημέρα της συντήρησης στους 6 – 7°C ήταν κατά μέσο όρο 147,3 ppm, σημαντικά μικρότερη δηλαδή από αυτή που αναφέρουν οι López-Sabater και συν. Αντίθετα σε μεγάλα κομμάτια τόννου που συντηρήθηκαν για δώδεκα ημέρες στους 0°C οι López-Sabater και συν. δεν ανίχνευσαν ισταμίνη. Η συγκέντρωση ισταμίνης των τόννων – μαρτύρων του πειράματός μας που συντηρήθηκαν στους 0 – 2°C μετά από 12 ημέρες συντήρησης, ήταν αρκετά χαμηλή (33,5 ppm), συμφωνώντας εν μέρει με τα αποτελέσματα των López-Sabater και συν.

Οι Guizani και συν. (2005), αναφέρουν ότι σε κιτρινόπτερους τόννους που συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 0°C και 8°C οι συγκεντρώσεις ισταμίνης που μέτρησαν ήταν 6,1 ppm μετά από 12 ημέρες συντήρησης και 150 ppm μετά από οκτώ ημέρες συντήρησης αντίστοιχα. Στη μελέτη μας, η συγκέντρωση ισταμίνης που μετρήσαμε στους νωπούς τόννους – μάρτυρες μετά από δώδεκα ημέρες συντήρησης στους 0 – 2°C (33,5 ppm) και οκτώ ημέρες συντήρησης στους 6 – 7°C (147 ppm), είναι παρόμοιες με αυτές με αυτές που αναφέρουν οι Guizani και συν.

Τα αποτελέσματά μας επίσης συμφωνούν και με αυτά των Kim και Price (1999), οι οποίοι ανίχνευσαν χαμηλές συγκεντρώσεις ισταμίνης (80 ppm) σε άσπρο τόννο, που συντηρήθηκε στους 0°C για 18 ημέρες.

Οι Middlebrooks και συν. (1988) βρήκαν σε σκουμπριά, που συντηρήθηκαν στους 0°C, συγκεντρώσεις ισταμίνης κατά μέσο όρο <6 ppm. Στα δικά μας πειράματα οι συγκεντρώσεις ισταμίνης των μαρτύρων που συντηρήθηκαν στους 0 – 2°C ήταν μεγαλύτερες (33,5 ppm).

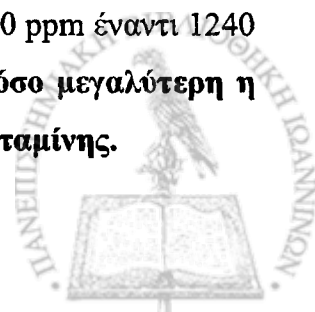
Οι Bennour και συν. (1991) μέτρησαν σε σκουμπριά που συντηρήθηκαν για 12 ημέρες σε ψυγείο με θερμοκρασία 4°C και με προσθήκη πάγου σε αναλογία 1:2, 1:3 και 1:4 w/w (θερμοκρασία ψαριού μεταξύ 0°C και 4°C), συγκεντρώσεις ισταμίνης 46, 96 και 136 ppm αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι υψηλότερες από τις συγκεντρώσεις (33,5 ppm),



που μετρήσαμε στα πειράματα μας στους μάρτυρες που συντηρήθηκαν στους 0 – 2°C. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην μικρή ποσότητα πάγου (αναλογίες 1:3 και 1:4) που χρησιμοποιήθηκε στα σκουμπριά με την υψηλότερη συγκέντρωση ισταμίνης (96 και 136 ppm αντίστοιχα).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας οι συγκεντρώσεις ισταμίνης στους ναπούς τόννους που υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση, ήταν μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες των αποψυγμένων. Συγκεκριμένα στους τόννους που συντηρήθηκαν στους 0 – 2°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C, οι ναποί τόννοι μετά από 12 ημέρες είχαν συγκέντρωση ισταμίνης κατά μέσο όρο 258,3 ppm, ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση στους αποψυγμένους τόννους ήταν 32,3 ppm. Αντίστοιχα στους τόννους που συντηρήθηκαν στους 6 – 7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C, οι ναποί τόννοι μετά από 12 ημέρες είχαν συγκέντρωση ισταμίνης κατά μέσο όρο 1962 ppm, ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση στους αποψυγμένους τόννους ήταν 1375,6 ppm. Ωστόσο η διαφορά αυτή δεν τεκμηριώνεται στατιστικά ($p > 0,05$), πιθανώς λόγω της μεγάλης διακύμανσης μεταξύ των συγκεντρώσεων ισταμίνης της κάθε ομάδας. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Baranowski και συν. (1990) οι οποίοι παρατήρησαν ότι ο χρόνος συντήρησης των ψαριών σε θερμοκρασία κατάψυξης είναι σημαντικός ανασταλτικός παράγοντας για την παραγωγή ισταμίνης. Στα πειράματά τους οι μεγαλύτεροι χρόνοι συντήρησης υπό κατάψυξη είχαν ως αποτέλεσμα την μικρότερη παραγωγή ισταμίνης. Έτσι οι ερευνητές αυτοί κατέληξαν ότι πιθανώς η διαδικασία κατάψυξης – απόψυξης προκαλεί την καταστροφή ή / και τραυματισμό σημαντικού μέρους της μικροβιακής χλωρίδας με αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή ισταμίνης.

Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν την άποψη, που έχει εκφραστεί και από άλλους ερευνητές οι οποίοι πειραματίστηκαν με συγγενή είδη ψαριών, ότι η συγκέντρωση ισταμίνης στους θερμικά κακομεταχειρισμένους τόννους εξαρτάται από τη θερμοκρασία και τη διάρκεια συντήρησης και τη θερμοκρασία και τη διάρκεια της κακομεταχείρισης. Σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις ισταμίνης που μετρήσαμε σε φιλέτα τόννου [Πίνακας 20, Γράφημα 5] οι συγκεντρώσεις ισταμίνης των φιλέτων τόννου ήταν μεγαλύτερες στους τόννους που υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση για 3 ώρες καθημερινά από τις συγκεντρώσεις των τόννων που υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση για 1 ώρα καθημερινά (2500 ppm έναντι 101,5 ppm για τα φιλέτα τόννου που συντηρούνταν στους 0 – 2°C και 2140 ppm έναντι 1240 ppm για τα φιλέτα τόννου που συντηρούνταν στους 5 – 7°C). Συνεπώς όσο μεγαλύτερη η διάρκεια θερμικής κακομεταχείρισης τόσο μεγαλύτερη η παραγωγή ισταμίνης.



Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης των νωπών και αποψυγμένων τόννων που υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C και συντηρήθηκαν στους 6-7°C (1962 ppm και 1375,6 ppm αντίστοιχα μετά από 12 ημέρες θερμικής κακομεταχείρισης) ήταν πολύ μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των νωπών και αποψυγμένων τόννων που υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C και συντηρήθηκαν στους 0 – 2°C (258,3 ppm και 32,3 ppm αντίστοιχα μετά από 12 ημέρες θερμικής κακομεταχείρισης). Από αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ότι **όσο υψηλότερη η θερμοκρασία συντήρησης τόσο περισσότερη ισταμίνη παράγεται.**

Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι η θερμοκρασία συντήρησης και η διάρκεια των χειρισμών σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος (25-30°C) είναι οι κρίσιμοι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της ισταμίνης στα ψάρια. Στα εστιατόρια και στους λοιπούς χώρους εστίασης, όπου οι πόρτες των ψυκτικών θαλάμων ανοιγοκλείνουν συχνά, η μέση θερμοκρασία συντήρησης είναι συνήθως >7°C. Ειδικά στις περιπτώσεις όπου ο έλεγχος της θερμοκρασίας των ψυγείων είναι πλημμελής, είναι δυνατόν οι θερμοκρασίες να είναι μεγαλύτερες (>10 °C) και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε τοξικές συγκεντρώσεις ισταμίνης σε πολύ συντομότερο χρόνο από τον προβλεπόμενο χρόνο συντήρησής τους, με σοβαρές συνέπειες για τη Δημόσια Υγεία.

Εκτός από την θερμοκρασία και την διάρκεια συντήρησης, η παραγωγή ισταμίνης στον μυϊκό ιστό των ψαριών επηρεάζεται και από το είδος της μικροβιακής χλωρίδας των ψαριών. Ούτως ή άλλως οι παραπάνω ευνοϊκές για την ισταμίνη συνθήκες (υψηλή θερμοκρασία, παρατεταμένη συντήρηση) είναι εξίσου ευνοϊκές και για τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων. Ιδιαίτερα μάλιστα εάν στην μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών υπάρχουν ισταμινοπαραγωγά βακτήρια, τότε αυτά πολλαπλασιάζονται υπέρμετρα και παράγονται με αυξημένο ρυθμό αποκαρβοξυλάσες της ιστιδίνης. Οι αποκαρβοξυλάσες της ιστιδίνης παράγουν ισταμίνη τόσο κατά τη συντήρηση των τόννων, όσο και κατά τη θερμική κακομεταχείριση αυτών. Όμως κατά τη διάρκεια – της χρονικά μεγαλύτερης – συντήρησης η ισταμίνη παράγεται με αργό ρυθμό, ενώ κατά τη διάρκεια – της χρονικά συντομότερης – θερμικής κακομεταχείρισης παράγεται με γρήγορο ρυθμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση της συγκέντρωσης ισταμίνης σε θερμικά κακομεταχειρισμένους τόννους (Tanase και συν, 1985· Lehane και Olley, 2000).

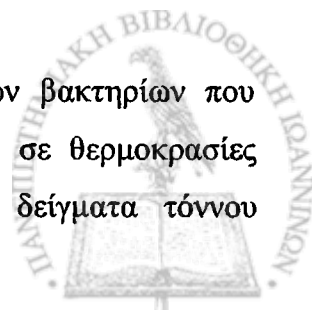
Στην μελέτη μας βρέθηκε συσχετισμός μεταξύ των συγκεντρώσεων ισταμίνης και της ολικής μεσόφιλη χλωρίδας στους 30°C, της καταμέτρησης Εντεροβακτηριακών και της καταμέτρησης κολοβακτηριοειδών. Ο παράγοντας συσχετισμού r^2 ήταν μεγάλος στους τόννους που συντηρήθηκαν στους 6 – 7°C. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η ομάδα τόννων



εμφάνισε και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ισταμίνης που παρατηρήθηκαν μεταξύ των ολόκληρων τόννων. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί από το γεγονός ότι οι συγκεκριμένοι βακτηριακοί δείκτες αφορούν κυρίως μεσόφιλα βακτήρια. Συνεπώς είναι επόμενο οι συγκεκριμένες βακτηριακές καταμετρήσεις να περιλαμβάνουν τα περισσότερα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια, που αναπτύσσονται σε αυτές τις θερμοκρασίες και να σχετίζονται άμεσα με την ποσότητα ισταμίνης που παράγεται, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τα πειραματικά μας δεδομένα. Με την άποψη ότι βακτήρια που περιλαμβάνονται σε αυτές οι βακτηριακές ομάδες είναι αυτά που κυρίως ευθύνονται για την παραγωγή ισταμίνης στα ψάρια συμφωνούν και άλλοι ερευνητές. Συγκεκριμένα οι Stratton και Taylor (1991) αναφέρουν ότι τα εντερικής προέλευσης βακτήρια και κυρίως η *Morganella morganii*, οι *Klebsiella* spp. και η *Hafnia alvei* αποτελούν τους κατεξοχήν παραγωγείς ισταμίνης σε ψάρια που συντηρούνται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 4°C. Ο Taylor (1983) αναφέρει ότι τα βακτήρια που συχνότερα εμπλέκονται στην πρόκληση δηλητηρίασης από ισταμίνη είναι τα Εντεροβακτηριακά. Μάλιστα ειδικά για τις καταμετρήσεις των Εντεροβακτηριακών και κολοβακτηριοειδών, αναφέρεται ότι τα βακτήρια που καταμετρούνται οφείλονται κυρίως σε επιμόλυνση (Gram και Huss, 1996). Η παρατήρηση των Hernández – Herrero και συν. (1999) ότι τα βακτήρια επιμόλυνσης είναι αυτά, που ευθύνονται για την παραγωγή ισταμίνης στα ψάρια, συμφωνεί με τα συμπεράσματα της δικής μας έρευνας ότι αυτές οι παράμετροι συσχετίζονται με την παραγωγή ισταμίνης. Συνεπώς υπάρχει αποδεδειγμένα συσχετισμός μεταξύ της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, της καταμέτρησης Εντεροβακτηριακών και της καταμέτρησης κολοβακτηριοειδών και της παραγωγής ισταμίνης (Γραφήματα 9-11).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στα Εντεροβακτηριακά, στους Σταφυλόκοκκους, στις Ψευδομονάδες και στα Οξυγαλακτικά βακτήρια, παρατηρήθηκε εκθετική αύξηση στις καταμετρήσεις στην διάρκεια της κακομεταχείρισης, από την ημέρα 0 έως την 12^η ημέρα [Πίνακας 22], η οποία είναι αναμενόμενη, ιδιαίτερα σε ευνοϊκές για τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων θερμοκρασίες, όπως στο πείραμα μας (30°C). Αντίθετα στα θειοαναγωγικά βακτήρια οι καταμετρήσεις παρέμειναν σταθερά χαμηλές τόσο κατά τη διάρκεια της συντήρησης όσο και της θερμικής κακομεταχείρισης. Αυτή η παρατήρηση είναι δυνατόν να αποδοθεί στη μειωμένη ικανότητα ορισμένων ειδών Κλωστηριδίων (π.χ. *Cl. perfringens*) να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν σε θερμοκρασίες μικρότερες των 15°C, όπως έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (McClane, 1997).

Σύμφωνα με τους Ben-Gigirey και συν. (1999), η επιβίωση των βακτηρίων που εμπλέκονται στην παραγωγή βιογενών αμινών στα ψάρια είναι πτωχή σε θερμοκρασίες κατάψυξης. Στα πειράματα μας με καταψυγμένα και αποψυγμένα δείγματα τόννου



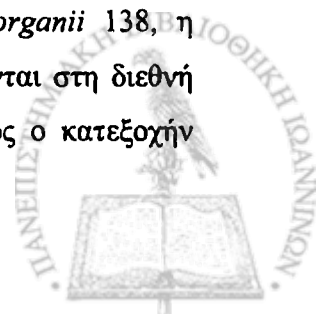
παρατηρήσαμε επίσης χαμηλότερες συγκεντρώσεις ισταμίνης, γεγονός, που επιβεβαιώνει την άποψη ότι η κατάψυξη των ψαριών είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος αποφυγής παραγωγής βακτηριακών αποκαρβοξυλασών της ιστιδίνης και συνεπώς αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο πρόληψης της παραγωγής ισταμίνης στον τόννο, ακόμα και όταν συντηρείται σε θερμοκρασίες άνω των 0°C μετά την κατάψυξη. Ανάλογες είναι οι παρατηρήσεις των Taylor και Speckhard (1983), οι οποίοι αναφέρουν ότι για την απομόνωση ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων από κατεψυγμένο τόννο χρησιμοποίησαν εικοσιτετράωρο προεμπλουτισμό για να καταφέρουν να ανιχνεύσουν τους μικροοργανισμούς.

Όσον αφορά τον συσχετισμό μεταξύ παραγωγής ισταμίνης και διαφόρων ειδών βακτηρίων, οι περισσότεροι ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τα γνωστά είδη ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων, ενώ ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν σχετικά με την παραγωγή ισταμίνης σε σχέση με τους καθιερωμένους μικροβιακούς δείκτες των ψαριών.

Στη μελέτη μας τα βακτήρια που ταυτοποιήσαμε ως παραγωγείς ισταμίνης ανήκουν στην πλειοψηφία τους στα Εντεροβακτηριακά (87%). Σύμφωνα με τους Gram και Huss (1996) η φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών απαρτίζεται κυρίως από ψυχρότροφα Gram αρνητικά βακτήρια που ανήκουν στα είδη *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp., *Acinetobacter* spp., *Shewanella* spp., *Flavobacterium* spp., *Vibrionaceae* και *Aeromonadaceae* και Gram θετικά βακτήρια, όπως *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Corynebacterium*.

Η παρουσία στα δείγματα μας ειδών βακτηρίων, όπως *Klebsiella* spp, *M. morgani*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Proteus* spp. και *Salmonella* spp., τα οποία δεν περιλαμβάνονται στα προαναφερόμενα είδη της φυσιολογικής χλωρίδας και τα οποία σύμφωνα με τους Lehane και Olley, (2000) είναι ισταμινοπαραγωγά βακτήρια, φαίνεται πως είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης. Στο ίδιο συμπέρασμα έχουν καταλήξει και οι Gram και Huss (1996) και Hernández – Herrero και συν. (1999). Οι τελευταίοι μάλιστα θεωρούν ότι και τα Gram-θετικά βακτήρια που συχνά επιμολύνουν τα ψάρια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ισταμίνης ειδικά στον τόννο.

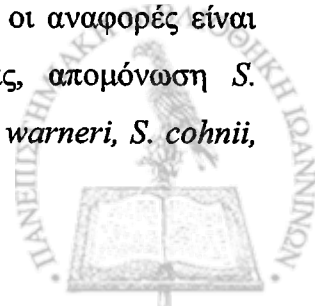
Στη διάρκεια της μελέτης μας απομονώθηκαν στελέχη *Morganella morgani*, που παρουσίαζαν μεγάλο εύρος παραγωγής ισταμίνης. Ειδικότερα ένα στέλεχος (*Morganella morgani* 138) παρήγαγε πολύ μεγάλη ποσότητα ισταμίνης (24499 ppm) και ήταν ο πιο ενεργός παραγωγός ισταμίνης, ενώ το στέλεχος *Morganella morgani* 184 παρήγαγε σχετικά μικρή ποσότητα (20 ppm). Ειδικότερα για το στέλεχος *Morganella morgani* 138, η ποσότητα ισταμίνης που παρήγαγε είναι από τις μεγαλύτερες που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Η *Morganella morgani* είναι το βακτήριο που θεωρείται ως ο κατεξοχήν



παραγωγός ισταμίνης. Οι Frank και συν. (1985) απομόνωσαν 8 στελέχη του βακτηρίου από κορυφαίνα, τα οποία παρήγαγαν κατά μέσο όρο 1165 ppm ισταμίνης. Οι Ababouch και συν. (1991) απομόνωσαν 7 στελέχη *M. morgani* από σαρδέλες που παρήγαγαν 2680 έως 3870 ppm ισταμίνης. Οι López – Sabater και συν. (1994) απομόνωσαν 17 στελέχη του βακτηρίου από τόννο που παρήγαγαν κατά μέσο όρο 2728,6 ppm ισταμίνης.

Στην μελέτη μας, δύο στελέχη *Klebsiella oxytoca* χαρακτηρίστηκαν ως ταχείς παραγωγείς ισταμίνης. Αυτό το εύρημά μας συμφωνεί με τα αποτελέσματα των López – Sabater και συν. (1994), των Rodríguez – Herez και συν. (1994b) και των Hernández – Herrero και συν. (1999). Οι ποσότητες ισταμίνης που παρήγαγαν τα στελέχη *K. oxytoca* που αναφέρουν οι Rodríguez – Herez και συν. και οι Hernández – Herrero και συν. ήταν μικρότερες (69 ppm και 14,2 – 25,6 ppm αντίστοιχα) από αυτές που παρήγαγαν τα δικά μας στελέχη (2156 και 2149 ppm), ενώ οι ποσότητες ισταμίνης που παρήχθησαν από τα στελέχη που εξέτασαν οι López – Sabater και συν. είναι παρόμοιες (1868 ppm με τυπική απόκλιση 3144 ppm). Επιπλέον, τα στελέχη *Klebsiella oxytoca* παρήγαγαν ισταμίνη σε αντίθεση με τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, που δεν παρήγαγαν. Η *Klebsiella pneumoniae* αναφέρεται από τους Taylor και συν. (1979) ότι παράγει ισταμίνη σε ιδιαίτερα μεγάλες ποσότητες. Σύμφωνα όμως με τους Kanki και συν. (2002), οι Taylor και συν. (1979) απέδωσαν λαθεμένα την παραγωγή ισταμίνης στην *Klebsiella pneumoniae*. Το στέλεχος που παρήγαγε ισταμίνη ταυτοποιήθηκε αργότερα ως *Raoultella planticola*. Η διαφοροποίηση αυτών των βακτηρίων δεν είναι δυνατή με τις συνήθεις μεθόδους ταυτοποίησης (Kanki και συν., 2002). Οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν ότι τα στελέχη *Klebsiella oxytoca* και *Klebsiella pneumoniae* δεν παράγουν ισταμίνη, σε αντίθεση με την *Raoultella planticola* που πολλές φορές ταυτοποιείται εσφαλμένα ως *Klebsiella*.

Στην παρούσα μελέτη στους ταχείς παραγωγείς ισταμίνης, εκτός των αναφερθέντων ειδών βακτηρίων, περιελήφθησαν και δύο στελέχη Gram θετικών βακτηρίων, ο *Staphylococcus hominis* 357 και ο *Enterococcus hirae* 049. Η παραγωγή ισταμίνης από στελέχη *Staphylococcus* spp. έχει αναφερθεί και από άλλους συγγραφείς (Hernández – Herrero και συν., 1999). Συγκεκριμένα αναφέρεται η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ισταμίνης κυρίως σε αλίπαστα ψάρια από *S. epidermidis* και *S. capitis*, όχι όμως από *S. hominis*. Η παρουσία των Σταφυλόκοκκων είναι αρκετά συχνή στα αλίπαστα ψάρια με κύριο εκπρόσωπο το *S. xylosus* (Vilhelmsson και συν., 1997). Στα νωπά ψάρια οι αναφορές είναι σποραδικές. Ο Varvarigos (2001) αναφέρει, κατά σειρά συχνότητας, απομόνωση *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. lentus*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. cohnii*,



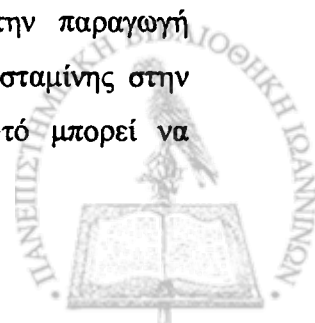
S. chromogenes και *S. aureus* από ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών (λαυρακιού και σπάρου) στην Ελλάδα.

Όσον αφορά τους Εντερόκοκκους, ο Tham (1988) αναφέρει παραγωγή μικρών ποσοτήτων ισταμίνης από στελέχη *Enterococcus faecalis* και *E. faecium* που είχαν απομονωθεί από τυρί. Όμως, η ποσότητα ισταμίνης που παρήγαγε το στέλεχος *Enterococcus hirae* 049 που απομονώσαμε (2404 ppm), είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από αυτή που αναφέρεται από τον Tham (4 ppm). Η παρουσία των *Enterococcus* spp. στα ψάρια είναι σχετικά σπάνια και οφείλεται σχεδόν πάντα σε επιμολύνσεις (Gram και Huss, 1996), οπότε η πιθανή συνεισφορά τους στην παραγωγή ισταμίνης είναι περιορισμένη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το ποσοστό των ταχέων ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων ήταν μικρό (10%) συγκριτικά με αυτό των βραδέων ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων ισταμίνης (39%) και των βακτηρίων που δεν παρήγαγαν ισταμίνη (51%). Όμως, η ολική ποσότητα ισταμίνης που παράχθηκε από όλα τα ταχέα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια σε θρεπτικό υπόστρωμα (συνολικά 47,42 mg ισταμίνης) ήταν σχεδόν εκατονταπλάσια από την ολική ποσότητα, που παρήγαγαν τα βραδέα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια (συνολικά 0,43 mg ισταμίνης). Κατά μέσο όρο η παραγωγή ισταμίνης των ταχέων ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων ήταν 6.775 ppm ανά στέλεχος, ενώ η αντίστοιχη παραγωγή ισταμίνης των βραδέων ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων ήταν 32,5 ppm ανά στέλεχος. Εάν υποθέσουμε ότι η παραγωγή ισταμίνης στα ψάρια γίνεται κατά ανάλογο τρόπο, τότε η συμβολή των βραδέων ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων στην άθροιση ισταμίνης στη σάρκα των ψαριών είναι μάλλον περιορισμένη.

Η ικανότητα παραγωγής ισταμίνης των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν μελετήθηκε βάσει της δοκιμής αποκαρβοξυλίωσης της ιστιδίνης, ορνιθίνης και λυσίνης με καλλιέργεια στο Møeller decarboxylase broth. Όλα τα στελέχη *Morganella morganii* που απομονώθηκαν, ήταν θετικά στις δοκιμές αποκαρβοξυλίωσης της ιστιδίνης και ορνιθίνης ενώ κανένα από αυτά δεν έδωσε θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της λυσίνης. Αυτά τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με την αναφορά των Holt και συν. (1995) σχετικά με τις παραγόμενες αποκαρβοξυλάσες από την *M. morganii*. Επίσης όλα τα στελέχη *Klebsiella oxytoca* που απομονώσαμε ήταν θετικά στις δοκιμές αποκαρβοξυλίωσης και των τριών αμινοξέων, ενώ οι Holt και συν. (1995) αναφέρουν απουσία της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης στην πλειοψηφία των ειδών *Klebsiella*.

Οι Σταφυλόκοκκοι που απομονώσαμε ήταν αρνητικοί ως προς την παραγωγή αποκαρβοξυλασών, παρά την ανίχνευση ιδιαίτερα μεγάλης συγκέντρωσης ισταμίνης στην καλλιέργεια του στελέχους *Staphylococcus hominis* 357. Το εύρημα αυτό μπορεί να



αιτιολογηθεί από το γεγονός ότι το Møeller decarboxylase broth στοχεύει στην ανίχνευση παραγωγής αποκαρβοξυλασών από Εντεροβακτηριακά και όχι από Gram θετικά βακτήρια (Bover-Cid και Holzapfel, 1999). Όσον αφορά τους Εντερόκοκκους, ο *E. hirae* 049 ήταν θετικός στις δοκιμές των αποκαρβοξυλασών και των τριών αμινοξέων, ενώ ο *E. faecalis* 075 ήταν αρνητικός σε όλες τις δοκιμές.

Το Møeller decarboxylase broth αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα ελέγχου της ικανότητας αποκαρβοξυλίωσης αμινοξέων των Εντεροβακτηριακών, στα οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης και της λυσίνης για την ταυτοποίηση των βακτηρίων. Όμως τα αποτελέσματά του δεν είναι ακριβή, δεδομένου ότι οποιαδήποτε παραγόμενη αλκαλική ένωση είναι δυνατόν να μεταβάλλει το χρώμα του υποστρώματος με αποτέλεσμα τη λήψη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Pilsucki και συν., 1979). Παρόλα ταύτα η χρήση του δίνει πληροφορίες σχετικά με την παρουσία αυτών των αποκαρβοξυλασών στα βακτήρια.

Οι αποκαρβοξυλάσες της ιστιδίνης, ορνιθίνης και λυσίνης παράγονται από τα διάφορα βακτήρια με διαφορετική συχνότητα, χωρίς να υπάρχει συγκεκριμένος συσχετισμός της παρουσία τους με το είδος του βακτηρίου. Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα των δικών μας δοκιμών, η παρουσία των αποκαρβοξυλασών μεταξύ βακτηρίων του ίδιου είδους δεν είναι πάντα σταθερή. Η παρατήρηση αυτή καθιστά ακόμα πιο δύσκολη την εκτίμηση της παθογόνου δράσης της ισταμίνης που παράγεται από βακτηριακά στελέχη.

Αξιολόγηση των εκλεκτικών υποστρωμάτων Niven, τροποποιημένου Niven και Møeller decarboxylase στην απομόνωση ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων.

Η εύκολη, γρήγορη και οικονομική ανίχνευση των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων είναι ιδιαίτερης σημασίας για τον αξιόπιστο μικροβιολογικό έλεγχο των τροφίμων. Η δημιουργία και η εργαστηριακή εφαρμογή ενός υποστρώματος ικανού να διαχωρίζει αξιόπιστα τα συγκεκριμένα βακτήρια θα ήταν ένα ιδιαίτερα χρήσιμο διαγνωστικό μέσο στην μικροβιολογία τροφίμων, σε σχέση με την έγκαιρη πρόβλεψη αυξημένης συγκέντρωσης ισταμίνης στα τρόφιμα (αλιεύματα – τυριά).

Στην μελέτη μας, αξιολογήθηκαν τα υποστρώματα Niven, Modified Niven και Møeller decarboxylase σε στερεή (άγαρ) και υγρή (ζωμός) μορφή. Τα υποστρώματα αυτά εξετάστηκαν με προσθήκη ιστιδίνης και χωρίς ιστιδίνη. Η σκοπιμότητα της καλλιέργειας βακτηρίων σε υπόστρωμα χωρίς ιστιδίνη ήταν να εξετασθεί κατά πόσο το θετικό αποτέλεσμα σε κάθε υπόστρωμα οφειλόταν μόνον στην παραγωγή ισταμίνης και όχι στην παραγωγή άλλων ουσιών, που θα μπορούσαν να αυξήσουν το pH του υποστρώματος, όπως η αμμωνία ή

άλλες βιογενείς αμίνες (Chen και συν., 1989). Με αυτό τον τρόπο εκτιμήθηκε ορθότερα το αποτέλεσμα κάθε καλλιέργειας στα υποστρώματα που μελετήθηκαν, ανεξάρτητα της ποσότητας ισταμίνης που παρήγαγε κάθε βακτήριο. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμές, προέρχονταν από τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους πειραματισμούς μας και η ικανότητα παραγωγής ισταμίνης εξετάστηκε με υπολογισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης στο υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας κάθε βακτηρίου με ανοσοενζυμική μέθοδο.

Το Niven agar αρχικά χρησιμοποιήθηκε από τους Niven και συν. (1981) για την ανίχνευση των Εντεροβακτηριακών που παράγουν ισταμίνη. Στην μελέτη μας, το Niven agar παρουσίασε τα ικανοποιητικότερα αποτελέσματα συγκριτικά με τα άλλα θρεπτικά υποστρώματα που εξετάστηκαν [Πίνακας 29]. Μεταξύ των ταχέων ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων, απέτυχε να ανιχνεύσει μόνο το στέλεχος *Staphylococcus hominis* 357, ενώ το στέλεχος *Enterococcus hirae* 049 έδωσε θετικό αποτέλεσμα και στην καλλιέργειά σε Niven agar χωρίς ιστιδίνη. Όπως αναφέρθηκε ο *Enterococcus hirae* 049 παρήγαγε αποκαρβοξυλάσες και για τα τρία αμινοξέα που εξετάστηκαν. Συνεπώς η αλλαγή χρώματος στο Niven agar χωρίς ιστιδίνη είναι πιθανόν να οφείλεται στην παραγωγή πουτρεσκίνης και καδαβερίνης ή άλλων αλκαλικών ενώσεων.

Από τα βραδέα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια (Πίνακας 29), τα τρία στα τέσσερα βακτήρια των οποίων οι καλλιέργειες ήταν θετικές στο Niven agar χωρίς ιστιδίνη, αποκαρβοξυλιώναν και τα τρία αμινοξέα. Το ίδιο διαπιστώθηκε και με τα περισσότερα ψευδώς θετικά βακτήρια που δεν αποκαρβοξυλιώνουν την ιστιδίνη. Συνεπώς ένα πρόβλημα που ανακύπτει από τη χρήση αυτού του υποστρώματος είναι ότι δίνει ψευδώς θετικά αποτελέσματα, πιθανώς λόγω της παραγωγής άλλων αλκαλικών ουσιών εκτός της ισταμίνης. Πάντως το ποσοστό απομόνωσης των βακτηρίων που παράγουν ισταμίνη είναι ικανοποιητικό για την εφαρμογή του υποστρώματος στην πράξη, πιθανώς σε συνδυασμό με μια απλή μέθοδο ανίχνευσης της ισταμίνης στο υπερκείμενο υγρό (π.χ. ELISA).

Το πρόβλημα των ψευδώς θετικών βακτηρίων στο Niven agar έχει επισημανθεί και από τους Ababouch και συν. (1991). Το ποσοστό όμως ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που αναφέρουν (48%) είναι σαφώς μεγαλύτερο από το δικό μας (33%). Τα αποτελέσματα του Ababouch είναι παρόμοια με αυτά των Ben Gigirey και συν. (1999), όπου μεταξύ 19 θετικών στο Niven agar στελεχών τα 10 δεν παρήγαγαν ισταμίνη. Επίσης οι Hernández – Herrera και συν. (1999) αναφέρουν ότι το ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων ήταν ίσο με 37% μεταξύ 2192 βακτηριακών στελεχών απομονωμένων από αλίπαστες σαρδέλες. Τα

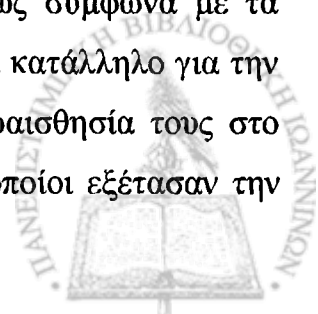


βακτηριακά στελέχη που απομόνωσαν ήταν κατά 83% Gram θετικά βακτήρια εκ των οποίων το 76% ήταν Σταφυλόκοκκοι.

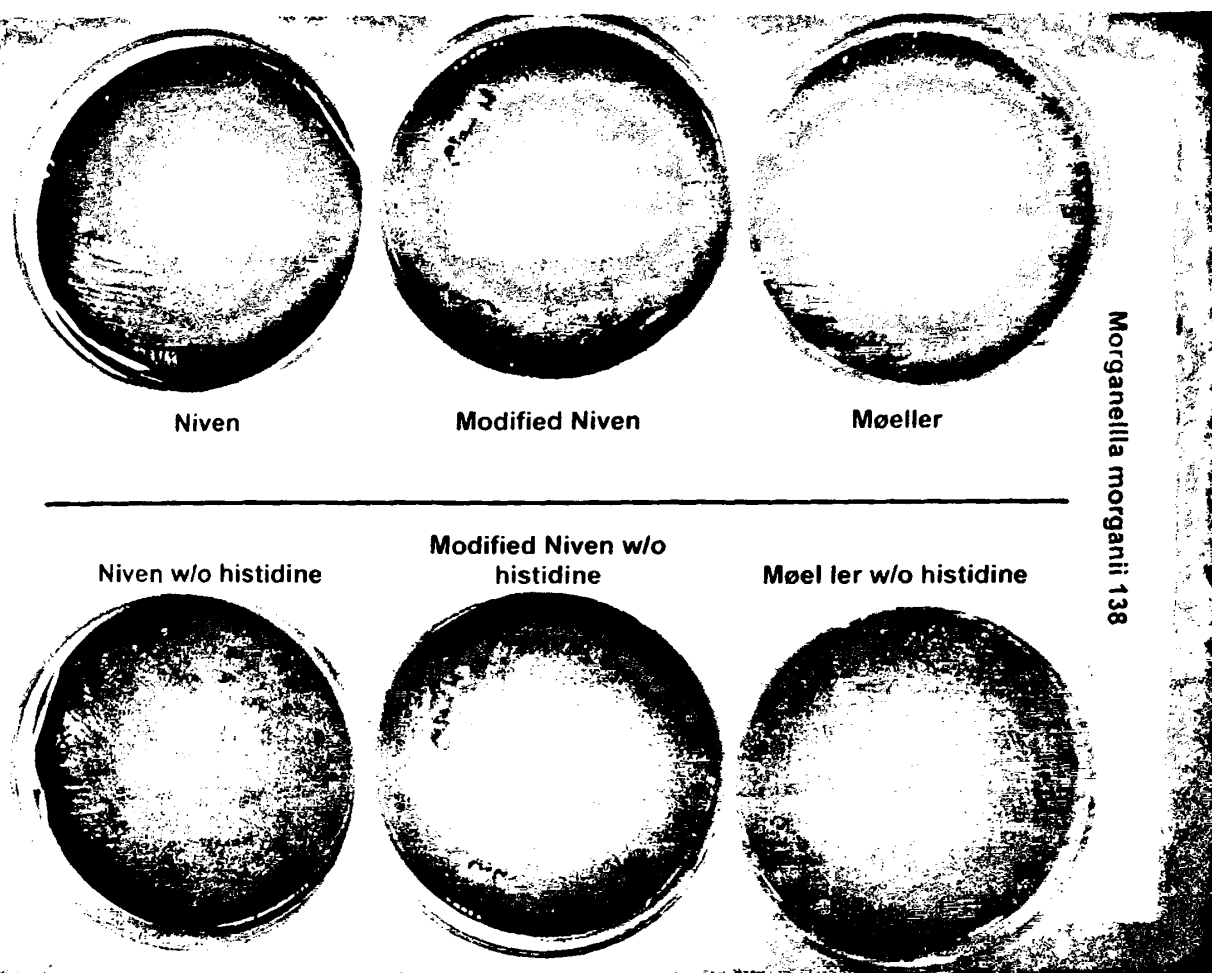
Ένα ακόμα πρόβλημα που παρατηρήθηκε στην μελέτη μας ήταν ότι το 33% των καλλιιεργειών βακτηρίων που δεν παράγουν ισταμίνη, ήταν θετικές στο Niven agar με ιστιδίνη, ενώ ήταν αρνητικές στο Niven agar χωρίς ιστιδίνη. Αυτή η παρατήρηση δεν είναι σύμφωνη με τη θεωρία ότι τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, που παρατηρούνται στο Niven agar οφείλονται στον καταβολισμό θρεπτικών ουσιών του υποστρώματος και όχι της ιστιδίνης. Πιθανώς η παραγωγή αλκαλικών ουσιών οφείλεται σε καταβολισμό της ιστιδίνης με μεταβολική οδό που καταλήγει στην παραγωγή αλκαλικών ενώσεων διαφορετικών της ισταμίνης. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τις καταβολικές οδούς που περιέγραψαν οι Magasanik και Bowser (1955) για τη *Klebsiella aerogenes* και οι Lessie και Niedhardt (1967) για τις Ψευδομονάδες.

Στο Modified Niven agar ανιχνεύτηκε σαφώς μικρότερο ποσοστό ταχέων και βραδέων ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων από ότι στο Niven agar. Επιπλέον, αρκετά βακτήρια έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στο αντίστοιχο υπόστρωμα χωρίς ιστιδίνη. Κατά την άποψή μας, οι δύο αυτές παρατηρήσεις καθιστούν ακατάλληλο το Modified Niven agar για εφαρμογή στην ανίχνευση βακτηρίων που παράγουν ισταμίνη. Επίσης η διαφοροποίηση των βακτηρίων βάσει της μορφολογίας των αποικιών τους (χρώμα) ήταν πιο δυσχερής από ότι στο Niven agar. Το Modified Niven agar αποδείχτηκε στην πράξη αρκετά δύσχρηστο, διότι το αρχικό πορτοκαλί χρώμα του υποστρώματος μεταβαλλόταν σε ροδίζον κόκκινο έως βαθύ κόκκινο σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος με αποτέλεσμα η επισήμανση αλλαγής χρώματος να απαιτεί πολύ καλή εμπειρία στη χρήση του υποστρώματος. Στην Εικόνα 10 βλέπουμε τις καλλιέργειες του στελέχους *M. morgani* 138 (το πιο ταχύ ισταμινοπαραγωγό βακτήριο από αυτά που απομονώθηκαν) που παρουσίαζαν έντονα τα χαρακτηριστικά διαφοροποίησης των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων στα εξετασθέντα καλλιιεργητικά υποστρώματα.

Οι Yoshinaga και Frank (1982) τροποποίησαν το Niven medium με σκοπό τη δυνατότητα ανίχνευσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων που δεν αναπτύσσονται στο μειωμένο pH του Niven agar. Για αυτό τα λόγο ερευνητές όπως οι López – Sabater και συν. (1994) χρησιμοποιούν το Modified Niven agar για την καταμέτρηση και απομόνωση ευαίσθητων στο μειωμένο pH βακτηρίων, όπως τα Κλωστηρίδια. Όμως σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραματισμών μας, το Modified Niven agar δεν είναι κατάλληλο για την ανίχνευση των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων, ανεξάρτητα από την ευαισθησία τους στο pH. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Actis και συν. (1999), οι οποίοι εξέτασαν την



ικανότητα του υποστρώματος να διαφοροποιήσει βακτήρια γενετικά τροποποιημένα ως προς την παραγωγή αποκαρβοξυλάσης της ιστιδίνης.



ικόνα 10. Καλλιέργειες του στελέχους *M. morganii* 138

Το Møller decarboxylase agar παρουσίασε το χαμηλότερο ποσοστό ψευδών θετικών αποτελεσμάτων. Το υπόστρωμα όμως ανίχνευσε σχετικά χαμηλά ποσοστά των ταχέων και βραδέων ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων (57% και 42% αντίστοιχα), ενώ παρουσίασε ευδώς θετικά αποτελέσματα συγκρίσιμα με εκείνα του Niven agar. Πιθανώς αυτό να οφείλεται στο ότι η διαφορά χρώματος μεταξύ θετικού και αρνητικού αποτελέσματος ήταν ιδιαίτερα μικρή. Παρότι το Møller decarboxylase agar έχει παρόμοια σύνθεση με το Niven agar και το συγκριτικό πλεονέκτημα ότι περιέχει φωσφορική πυριδοξάλη (συνένζυμο των αποκαρβοξυλασών της ιστιδίνης των Gram αρνητικών βακτηρίων) τα αποτελέσματά του είναι σαφώς υποδεέστερα από αυτά του Niven agar.

Το Niven broth παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσης ταχέων και βραδέων ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων. Όμως το μικρό ποσοστό ανίχνευσης βραδέων ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων καθιστά προβληματική την εργαστηριακή εφαρμογή του.

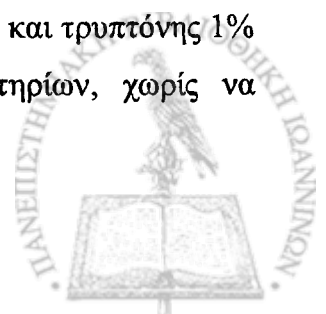


Άξιο παρατήρησης είναι το γεγονός ότι στους θρεπτικούς ζωμούς που εξετάστηκαν δεν εμφανίστηκαν θετικές καλλιέργειες στα υποστρώματα χωρίς ιστιδίνη. Η παρατήρηση αυτή κάνει ακόμα πιο πιθανή την υπόθεση ότι διάφορες πτητικές αλκαλικές ενώσεις, όπως η αμμωνία ή άλλες βιογενείς αμίνες (Chen και συν., 1989), επηρεάζουν το χρώμα των εκλεκτικών υποστρωμάτων ανίχνευσης της ισταμίνης που αναφέρθηκαν.

Παράλληλα με την αξιολόγηση των εκλεκτικών υποστρωμάτων Niven, τροποποιημένου Niven και Møller decarboxylase στην απομόνωση ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων, έγινε προσπάθεια δημιουργίας νέου εκλεκτικού υποστρώματος για ισταμινοπαραγωγά βακτήρια πτωχού σε θρεπτικές ουσίες. Συγκεκριμένα έγινε προσπάθεια εκτίμησης διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή ισταμίνης σε ένα εκλεκτικό υπόστρωμα απομόνωσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων. Για τον σκοπό αυτό περιορίστηκαν ορισμένα θρεπτικά στοιχεία του υποστρώματος, ώστε να μην παραχθούν άλλες αλκαλικές ενώσεις εκτός της ισταμίνης, οι οποίες θεωρούνται ότι είναι υπεύθυνες για τον αυξημένο αριθμό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων στα εκλεκτικά υποστρώματα ανίχνευσης των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων.

Στο υπόστρωμα με την μικρότερη συγκέντρωση τρυπτόνης από αυτά που εξετάστηκαν (Πίνακας 32) είχαμε πτωχή ανάπτυξη των βακτηρίων, γεγονός που υποδεικνύει ότι η συγκέντρωση τρυπτόνης πρέπει να υπερβαίνει το 0,1% για να έχουμε ικανοποιητική ανάπτυξη των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων. Στα υποστρώματα με συγκεντρώσεις τρυπτόνης 0,5% και 1% η ανάπτυξη των βακτηρίων ήταν καλή. Στα υποστρώματα με pH 6,00 (υποστρώματα 1 έως 8, Πίνακες 30 και 31), παρουσιάστηκαν διαφορές μεταξύ των υποστρωμάτων – μαρτύρων και των υποστρωμάτων που περιείχαν ιστιδίνη μόνο σε καλλιέργειες *M. morgani*. Το ίδιο ίσχυσε και για την πλειονότητα των υποστρωμάτων με pH 6,50, με εξαίρεση το υπόστρωμα 13 [Πίνακας 32], όπου όλες οι καλλιέργειες των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων είχαν αυξημένο pH, σε αντίθεση με την *Klebsiella pneumoniae* 344.

Τα ευρήματα αυτά δεν επιτρέπουν την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις ιδανικές παραμέτρους pH, συγκέντρωσης ιστιδίνης, παρουσίας φωσφορικής πυριδοξάλης και συγκέντρωσης τρυπτόνης που πρέπει να έχει ένα εκλεκτικό για τα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια υπόστρωμα. Είναι δυνατόν όμως να ειπωθεί με σχετική ασφάλεια ότι σύνθεση εκλεκτικού υποστρώματος με συγκέντρωση ιστιδίνης μεγαλύτερης του 2% και τρυπτόνης 1% είναι επαρκής για τη διαφοροποίηση των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων, χωρίς να απαιτείται η παρουσία φωσφορικής πυριδοξάλης.



Η αξιολόγηση των μεθόδων που χρησιμοποιήσαμε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ισταμίνης στα δείγματα τόννου στην διάρκεια της μελέτης μας έδειξε ότι η φθορισμομετρική μέθοδος έχει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (10 ppm) σε σχέση με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA Histamine Veratox, η οποία δεν μπορεί να ανιχνεύσει συγκεντρώσεις ισταμίνης κάτω από 100 ppm και δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα μόνον όταν οι συγκεντρώσεις της ισταμίνης είναι άνω των 100 ppm. Η κοινοτική νομοθεσία ορίζει ότι, κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού υγειονομικού ελέγχου, η μέση συγκέντρωση ισταμίνης εννέα δείγματα ψαριών πρέπει να μην υπερβαίνει τα 100 ppm (Οδηγία 91/493/ΕΟΚ). Επομένως το απαιτούμενο κατώτερο όριο ανίχνευσης ισταμίνης πρέπει να είναι κατά πολύ μικρότερο των 100 ppm. Συνεπώς η συγκεκριμένη μέθοδος ELISA είναι ακατάλληλη για τον εργαστηριακό υγειονομικό έλεγχο ρουτίνας.

Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα αποτελέσματα του Chamberlain (2001), ο οποίος σε αντίστοιχη μελέτη συνέκρινε την μέθοδο ELISA Histamine Veratox με την φθορισμομετρική μέθοδο, που προτείνει η American Organization of Analytical Chemists (AOAC, 1995). Παρότι ο Chamberlain απέδωσε τα εσφαλμένα αποτελέσματα στην παρατεταμένη παραμονή των δειγμάτων υπό κατάψυξη (-40°C), παρατήρησε ότι η συγκεκριμένη ανοσοενζυμική μέθοδος υποεκτιμούσε τις συγκεντρώσεις ισταμίνης σε παλαμίδα και τόννο, ακόμα και όταν οι συγκεντρώσεις υπερέβαιναν τα 100 ppm με τη φθορισμομετρική μέθοδο.

Αντίθετα, οι Rogers και Staruszciewicz (2000) βρήκαν ότι οι τιμές της ELISA διαφέρουν μόνον κατά περίπου 2 ppm από αυτές της φθορισμομετρικής μεθόδου στο εύρος συγκεντρώσεων 0 – 50 ppm. Ο αριθμός όμως των δειγμάτων που χρησιμοποίησαν ήταν πολύ μικρός (11 δείγματα στο εύρος συγκεντρώσεων 0 – 50 ppm) και τα δείγματα τα οποία είχαν συγκέντρωση ισταμίνης μεγαλύτερη των 100 ppm δεν εξετάστηκαν περαιτέρω για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης.

Όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της ισταμίνης στα υπερκείμενα υγρά των καλλιιεργειών των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τους τόννους των πειραμάτων μας, η ανοσοενζυμική μέθοδος IBL Histamine ELISA που χρησιμοποιήσαμε, έδωσε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα και ήταν εύχρηστη, γρήγορη και οικονομική. Η μέθοδος σύμφωνα με τον κατασκευαστή έχει όριο ανίχνευσης 0,3 – 1 ppm σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών. Η καλή γραμμικότητα της μεθόδου στο εύρος συγκεντρώσεων ισταμίνης 0 – 219 ppm (συντελεστής συσχετισμού $r^2=0.982 - 0.991$) προτύπων διαλυμάτων ισταμίνης σε ζυμό *Møller decarboxylase* καθώς και το κόστος και η ταχύτητα εκτέλεσής της σε σύγκριση με την μέθοδο HPLC την κατέστησαν ιδανική για τον ακριβή και ταχύ



υπολογισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης. Η μέθοδος HPLC παρουσιάζει το συγκριτικό πλεονέκτημα της μερικής ταυτοποίησης της ανιχνευόμενης ένωσης. Στην περίπτωση όμως του συγκεκριμένου πειραματισμού, η μέθοδος ELISA που χρησιμοποιήθηκε ήταν ιδανική, λόγω της αναγκαιότητας εξέτασης μεγάλου αριθμού δειγμάτων και της ευκολίας χρήσης της μεθόδου ELISA έναντι της HPLC.

Γενικά, οι συγκεντρώσεις ισταμίνης που μετρούνται σε τόννους, οι οποίοι έχουν υποστεί θερμική κακομεταχείριση, αλλά δεν έχουν υπερβεί το χρόνο συντήρησής τους, προβληματίζει όσον αφορά τους πιθανούς κινδύνους για τη Δημόσια Υγεία. Επιπλέον, η πιθανότητα έκθεσης τόννων σε αυξημένες θερμοκρασίες κατά τη συντήρηση και κατεργασία τους στους χώρους παρασκευής γευμάτων είναι αρκετά μεγάλη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η συντήρηση των ψαριών πρέπει να γίνεται αυστηρά σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 4°C και να αποφεύγεται η παρατεταμένη έκθεσή τους σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 20°C. Επιπλέον, οι χειρισμοί των ψαριών πρέπει να γίνονται σε όσο το δυνατόν πιο σύντομο χρόνο και οι χώροι επεξεργασίας τους να κλιματίζονται.

Αξιολόγηση και εκτίμηση του κινδύνου διαρροϊκής δηλητηρίασης από κατανάλωση τοξικών δίθυρων

Η επιδημική έξαρση του Ιανουαρίου του 2000 της Θεσσαλονίκης χαρακτηρίστηκε ως διαρροϊκή δηλητηρίαση από κατανάλωση δίθυρων (DSP) με βάση το ιστορικό και τα συμπτώματα στους νοσηλευόμενους ασθενείς (πολύ μικρή περίοδος επώασης αμέσως μετά από κατανάλωση μυδιών, διάρροια, ναυτία, έμετος και κοιλιακό άλγος), την απομόνωση και ταυτοποίηση των δινομαστιγωτών *Dinophysis acuminata* και *Dinophysis sacculus* στα νερά του Θερμαϊκού κόλπου (Koukaras και Nikolaidis, 2002) και τα αποτελέσματα της εργαστηριακής εξέτασης των μυδιών τα οποία συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της επιδημικής έξαρσης και εστάλησαν στην Μονάδα Μικροβιολογίας Τροφίμων, Υδάτων και Περιβάλλοντος του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο ακριβής αριθμός των ατόμων που νόσησαν δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθεί λόγω της έλλειψης επαρκών στοιχείων. Ο αριθμός όμως των 120 ατόμων που προσήλθαν στα επείγοντα περιστατικά μέσα σε χρονικό διάστημα επτά ημερών υποδηλώνει επιδημική έξαρση της κατηγορίας των αναδυόμενων τροφιμογενών νόσων λόγω κατανάλωσης τοξικών μυδιών, και είναι η πρώτη που καταγράφεται στην Ελλάδα.

Η ανάλυση των δειγμάτων μυδιών που εξετάστηκαν στην διάρκεια της επιδημίας και εκείνων που συλλέχθηκαν μετά τον Ιανουάριο του 2000 έδειξε αυξημένες συγκεντρώσεις λιπόφιλων τοξινών, οι οποίες βάσει των συμπτωμάτων που παρατηρήθηκαν στα



πειραματόζωα μας, ανήκουν στην ομάδα τοξινών του οκαδαϊκού οξέος. Το εύρημα αυτό σε συνδυασμό με την ανίχνευση αυξημένου αριθμού κυττάρων του δινομαστιγιωτού *D. acuminata*, από τους Koukaras και Nikolaidis (2002), μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η υπεύθυνη τοξίνη για αυτή την επιδημική έξαρση ήταν το οκαδαϊκό οξύ. Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε (mouse bioassay) για την εξέταση των μυδιών έχει υιοθετηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση στην ενοποιημένη νομοθεσία περί ποιοτικών προδιαγραφών των δίθυρων (Απόφαση 2002/225/EK). Χαρακτηρίζεται από την ικανότητα ανίχνευσης οποιασδήποτε λιπόφιλης τοξικής ένωσης που ανευρίσκεται στα μύδια. Όμως η απουσία ειδικότητας έναντι συγκεκριμένων τοξινών δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση της τοξίνης των τοξικών μυδιών.

Τα δινομαστιγιωτά του είδους *Dinophysis acuminata* αποτελούν τα συχνότερα τοξινογόνα δινομαστιγιωτά στα ευρωπαϊκά θαλάσσια ύδατα και οι τοξίνες που συνήθως παράγουν είναι το οκαδαϊκό οξύ και η δινοφυσιτοξίνη - 1 (Kumagai και συν., 1986· Morono και συν. 2002). Οι κυριότερες DSP τοξίνες που ανιχνεύονται στα ευρωπαϊκά μύδια και κυρίως στα μύδια της Αδριατικής θάλασσας είναι το οκαδαϊκό οξύ και η DST - 2 (Draisci, 1995· Pavela - Vranic και συν., 2002), άποψη που συμφωνεί με την δική μας ότι η υπεύθυνη τοξίνη για την επιδημική έξαρση της Θεσσαλονίκης ήταν το οκαδαϊκό οξύ.

Πρέπει να τονιστεί ότι το τρίτο θετικό δείγμα που εξετάσαμε από την περιοχή της Χαλάστρας, συλλέχθηκε τον Μάρτιο του 2001 (ένα χρόνο δηλαδή μετά την επιδημική έξαρση), χρονική περίοδο κατά την οποία σύμφωνα με τους Koukaras και Nikolaidis (Koukaras και Nikolaidis, 2002) ανιχνεύτηκε και πάλι αυξημένος αριθμός κυττάρων *Dinophysis spp.* στα νερά του Θερμαϊκού. Ο σχετικά μεγάλος χρόνος θανάτου των ποντικών (μέσος χρόνος θανάτου 5 h) στους οποίους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά εκχύλισμα αυτού του δείγματος, υποδηλώνει μικρή συγκέντρωση τοξίνης μη ικανή να προκαλέσει την εκδήλωση συμπτωμάτων στους καταναλωτές. Εάν δεν είχε διενεργηθεί η εξέταση των συγκεκριμένων μυδιών, δεν θα γινόταν γνωστή η ύπαρξη DSP τοξινών στα μύδια της Χαλάστρας τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο.

Χαμηλή συγκέντρωση τοξινών περιείχε και το δείγμα μυδιών που εξετάσαμε από τον Αμβρακικό κόλπο, στο οποίο ο μέσος χρόνος θανάτου των ποντικών ήταν 9 h. Παρότι οι συγκεντρώσεις διαρροϊκών τοξινών ήταν μικρές σε αυτά τα δείγματα, δεν σημαίνει ότι τα μύδια ήταν ασφαλή προς κατανάλωση. Το οκαδαϊκό οξύ και οι δινοφυσιτοξίνες συσσωρεύονται στα όργανα στόχους, ακόμα και όταν λαμβάνονται σε υποκλινικές συγκεντρώσεις. Αυτό το γεγονός καθιστά επιτακτική την κατάρτιση και εφαρμογή προγράμματος συνεχούς επιτήρησης των μυδιών για την παρουσία διαρροϊκών τοξινών.



Οι τοξίνες των δινομαστιγωτών αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης καλλιέργειας μυδιών. Μεταξύ των τριών σημαντικότερων δηλητηριάσεων από κατανάλωση δίθυρων (αμνησιακή, παραλυτική και διαρροϊκή), η διαρροϊκή δηλητηρίαση (DSP) χαρακτηρίζεται από τα πιο ήπια οξέα συμπτώματα. Η χρόνια όμως λήψη υποκλινικών συγκεντρώσεων των τοξινών του διαρροϊκού συνδρόμου επιβαρύνει σημαντικά τον καταναλωτή λόγω των ισχυρών μεταλλαξιογόνων και ανοσοκατασταλτικών ιδιοτήτων τους. Εκτός των σημαντικότερων επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία, η παρουσία DSP τοξινών έχει τεράστιο οικονομικό κόστος λόγω της εφαρμογής απαγορεύσεων εξαλίευσης μυδιών κάθε φορά που υπάρχει υποψία παρουσίας τοξινών.

Στην περίπτωση του Θερμαϊκού κόλπου οι συνθήκες είναι ιδανικές για τον πολλαπλασιασμό των δινομαστιγωτών, λόγω της γεωγραφικής μορφολογίας του (κλειστός κόλπος με αυξημένη ηλιοφάνεια και αυξημένη θερμοκρασία) και της εκβολής σε αυτόν τριών μεγάλων ποταμών, του Γαλλικού, του Λουδία και του Αξιού (εκροή μεγάλων ποσοτήτων οργανικής ύλης από την πόλη της Θεσσαλονίκης και του κάμπου της κεντρικής Μακεδονίας και μείωση της αλατότητας λόγω προσαγωγής μεγάλης ποσότητας γλυκού νερού) (Gestal – Otero, 2000· Caropero και συν., 2001).

Παρόμοιες συνθήκες παρατηρούνται και στον Αμβρακικό κόλπο. Επίσης ο Αμβρακικός κόλπος γειτνιάζει με την Αδριατική θάλασσα στην οποία από τη δεκαετία του '80 έχουν καταγραφεί φαινόμενα κόκκινης παλίρροιας δινομαστιγωτών και τοξικές συγκεντρώσεις διαρροϊκών τοξινών στα μύδια της περιοχής (Fattorusso και συν., 1992· Viviani και συν., 1995· Draisci και συν., 1995· Ciminiello και συν., 1997· Ciminiello και συν., 1998· Draisci και συν., 1999· Caropero και συν., 2001· Pavela – Vranic και συν., 2002). Η πρώτη επιδημική έξαρση διαρροϊκής δηλητηρίασης από κατανάλωση μυδιών αλιευμένων από την Αδριατική παρουσιάστηκε στην Ιταλία το 1989 μετά την κατανάλωση μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*), που είχαν αλιευθεί από τη βόρεια Αδριατική θάλασσα (Boni και συν., 1990).

Η διαρροϊκή δηλητηρίαση από δίθυρα παραμένει μια τροφιμογενής νόσος, που συνήθως διαφεύγει της προσοχής των ιατρών λόγω των άτυπων οξέων συμπτωμάτων της (Gestal – Otero, 2000· Yasumoto, 2000· Vale και Sampayo, 2002). Η γνώση της παρουσίας της καθώς και οι ολοένα και περισσότερες αναφορές εμφάνισης της νόσου σε όλη σχεδόν την Ευρώπη, αλλά και σε άλλες ηπείρους, πρέπει να ευαισθητοποιήσει τις αρμόδιες αρχές και τους καταναλωτές. Εκτός αυτού είναι αναγκαία η επαγρύπνηση για την τυχόν εμφάνιση και άλλων τροφιμογενών δηλητηριάσεων από δινομαστιγωτά, όπως η παραλυτική και αμνησιακή δηλητηρίαση. Ο κοινός τρόπος μεταφοράς των δινομαστιγωτών μεταξύ των θαλασσιών

περιοχών, οι παρόμοιες περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται και η παρουσία των υπεύθυνων δινομαστιγωτών στις θάλασσες γειτονικών μας χωρών δεν αποκλείει την εμφάνισή αυτών των νόσων στο άμεσο μέλλον.



B.5. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

- Η συγκέντρωση ισταμίνης στα ψάρια εξαρτάται από το συνολικό χρόνο θερμικής κακομεταχείρισής τους.
- Η συντήρηση των πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασίες μικρότερες των 4°C.
- Η κατάψυξη επιβραδύνει την παραγωγή ισταμίνης ακόμα και σε ψάρια που αποψύχονται και συντηρούνται υπό ψύξη.
- Ο τρόπος απόψυξης των ψαριών δεν επηρεάζει τη συγκέντρωση ισταμίνης.
- Υπάρχει συσχετισμός μεταξύ της OMX, ολικών Εντεροβακτηριακών και ολικών Κολοβακτηριοειδών με την παραγωγή ισταμίνης στους τόννους
- Η μικροβιακή χλωρίδα των αλλοιωμένων τόννων στο τέλος του πρωτοκόλλου θερμικής κακομεταχείρισης αποτελούνταν κυρίως από Οξυγαλακτικά βακτήρια, Ψευδομονάδες και Εντεροβακτηριακά.
- Σε τόννους που συντηρούνται υπό ψύξη τα Θειαναγωγικά βακτήρια παραμένουν σε πολύ χαμηλούς αριθμούς καθόλη τη διάρκεια του χρόνου συντήρησης.
- Η μέθοδος Veratox Histamine ELISA δε συνιστάται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης ισταμίνης στη σάρκα των ψαριών.
- Τα βακτήρια *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus hominis* και *Enterococcus hirae* αποτελούν ισχυρά ισταμινοπαραγωγά βακτήρια.
- Το Niven agar παρουσίασε τα ικανοποιητικότερα αποτελέσματα συγκριτικά με τα υπόλοιπα θρεπτικά υποστρώματα που εξετάστηκαν.
- Το Modified Niven agar και το Møller decarboxylase agar δεν είναι κατάλληλα για την ανίχνευση των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων
- Στους θρεπτικούς ζωμούς δεν εμφανίστηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.
- Ένα εκλεκτικό υπόστρωμα για την ανίχνευση ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων πρέπει να έχει συγκέντρωση ιστιδίνης μεγαλύτερη του 2%, συγκέντρωση τρυπτόνης μεγαλύτερη από 1% και δεν απαιτείται η παρουσία φωσφορικής πυριδοξάλης.

Τέλος, από την εξέταση των δειγμάτων μυδιών για την παρουσία τοξινών του διαρροϊκού συνδρόμου των δίθυρων προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η επιδημική έξαρση του Ιανουαρίου του 2000 στη Θεσσαλονίκη οφείλεται σε λιπόφιλη τοξίνη της ομάδας τοξινών του οκαδαϊκού οξέος.



- Λιπόφιλες τοξίνες της ομάδας του οκαδαϊκού οξέος ανιχνεύτηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις σε μύδια αλιευμένα το πρώτο τρίμηνο του 2001. Η απουσία εκδήλωσης επιδημικής έξαρσης σε αυτή τη χρονική περίοδο δεν μειώνει τον κίνδυνο από τις ισχυρές μεταλλαξιογόνες και τερατογόνες ιδιότητες ακόμα και μικρών συγκεντρώσεων αυτών των τοξινών.
- Ανιχνεύτηκαν τοξίνες της ομάδας του οκαδαϊκού οξέος στα μύδια του Αμβρακικού κόλπου και συνεπώς το ενδεχόμενο μιας μελλοντικής επιδημικής έξαρσης στην περιοχή μας είναι υπαρκτό.

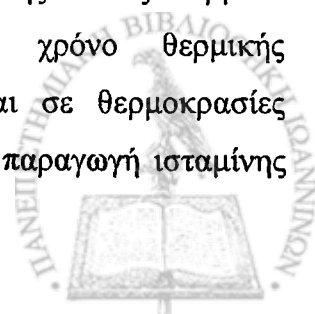


ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσης διατριβής ήταν η μελέτη της παραγωγής ορισμένων βιοτοξινών σε θαλασσινά τρόφιμα. Συγκεκριμένα μελετήθηκε: α) η παραγωγή ισταμίνης σε δείγματα τόννου, υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασιακής (κακο-) μεταχείρισης, β) η ικανότητα παραγωγής ισταμίνης από τα βακτηριακά στελέχη, που απομονώθηκαν από τα παραπάνω δείγματα τόννου, γ) η συμβολή του κάθε βακτηριακού στελέχους στη συγκέντρωση ισταμίνης στον μυϊκό ιστό του ψαριού, δ) η ικανότητα ανίχνευσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων έξι διαφορετικών εκλεκτικών υποστρωμάτων, ενώ παράλληλα έγινε προσπάθεια δημιουργίας νέων εκλεκτικών υποστρωμάτων τροποποιώντας τη σύνθεση των υπάρχοντων υποστρωμάτων και τέλος ε) διερευνήθηκε εργαστηριακά το αίτιο της επιδημικής έξαρσης τροφιμογενούς δηλητηρίασης εξαιτίας κατανάλωσης τοξικών μυδιών, η οποία εκδηλώθηκε στην περιοχή της Θεσσαλονίκης στην διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν φιλέτα τόννου και ολόκληροι τόννοι, που υποβλήθηκαν σε καθημερινή θερμική κακομεταχείριση. Οι τόννοι συντηρήθηκαν για 7-12 ημέρες σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης (0-2°C, 3-4°C και 6-7°C) και εκτέθηκαν για 2 h καθημερινά σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (20°C, 25°C και 30°C). Στη συνέχεια εξετάσθηκε η ικανότητα παραγωγής ισταμίνης από τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από τους θερμικά κακομεταχειρισμένους τόννους, καθώς και η συμβολή τους στην παραγωγή ισταμίνης. Τέλος εξετάσθηκε η ικανότητα ανίχνευσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων έξι εκλεκτικών υποστρωμάτων, του Niven agar και broth, του Modified Niven agar και broth και του Møller decarboxylase agar και broth, ενώ έγινε προσπάθεια δημιουργίας νέων εκλεκτικών υποστρωμάτων για ισταμινοπαραγωγή βακτήρια.

Ακόμη έγινε διερεύνηση του αιτίου της τροφιμογενούς επιδημίας διαρροϊκής δηλητηρίασης, που προσέβαλε τουλάχιστον 120 άτομα στην περιοχή της Θεσσαλονίκης στις 14 - 20 Ιανουαρίου 2000. Εξετάσθηκαν δείγματα μυδιών που συλλέχθηκαν μεταξύ Απριλίου 2000 και Απριλίου 2001 από το Θερμαϊκό και τον Αμβρακικό κόλπο για την παρουσία DSP τοξινών. Για την εξέταση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η βιολογική μέθοδος με χρήση ποντικών.

Η πειραματική μελέτη της θερμικής κακομεταχείρισης των τόννων και η εξέταση των απομονωθέντων βακτηρίων έδειξε ότι: 1) η συγκέντρωση ισταμίνης στους θερμικά κακομεταχειρισμένους τόννους εξαρτάται από το συνολικό χρόνο θερμικής κακομεταχείρισης, 2) η συντήρηση των τόννων πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασίες μικρότερες των 4°C και ότι η κατάψυξη των τόννων επιβραδύνει την παραγωγή ισταμίνης



ακόμα και σε τόννους που αποψύχονται και συντηρούνται υπό ψύξη, 3) Υπάρχει συσχετισμός μεταξύ της OMX, ολικών Εντεροβακτηριακών και ολικών Κολοβακτηριοειδών με την παραγωγή ισταμίνης στους τόννους, 4) η μέθοδος Veratox Histamine ELISA δε συνιστάται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ισταμίνης σε αλιεύματα, 5) τα βακτήρια *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus hominis* και *Enterococcus hirae* αποτελούν ισχυρά ισταμινοπαραγωγά βακτήρια.

Η εξέταση της ικανότητας ανίχνευσης των εκλεκτικών για τα ισταμινοπαραγωγά βακτήρια υποστρωμάτων έδειξε ότι το Niven agar δίνει τα ικανοποιητικότερα αποτελέσματα, με κύριο μειονέκτημα ότι παρουσιάζεται σημαντικό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, ενώ το Modified Niven agar και το Møller decarboxylase agar δεν είναι κατάλληλα για την ανίχνευση των ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων.

Η εξέταση των δειγμάτων μυδιών για την παρουσία DSP τοξινών έδειξε ότι η επιδημική έξαρση του Ιανουαρίου του 2000 στη Θεσσαλονίκη οφείλεται σε λιπόφιλη τοξίνη της ομάδας τοξινών του οκαδαϊκού οξέος, ενώ ανιχνεύτηκαν μικρές συγκεντρώσεις λιπόφιλων τοξινών της ομάδας του οκαδαϊκού οξέος και σε μύδια αλιευμένα τον Μάρτιο του 2001 από το Θερμαϊκό κόλπο. Επίσης ανιχνεύτηκαν μικρές συγκεντρώσεις λιπόφιλων τοξινών της ομάδας του οκαδαϊκού οξέος σε μύδια αλιευμένα τον Ιανουάριο του 2001 από τον Αμβρακικό κόλπο, και το ενδεχόμενο μελλοντικής επιδημικής έξαρσης DSP δηλητηρίασης στην περιοχή της ΒΔ Ελλάδος είναι υπαρκτό.



STUDY ON THE PRODUCTION OF MICROBIAL TOXINS IN SEAFOOD

Ph.D. Thesis

By

Vagelis Economou

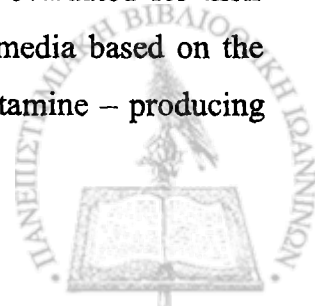
DVM

SUMMARY

The objective of the present thesis was the investigation of the conditions that cause production of marine biotoxins in seafood. Briefly we have investigated a) the production of histamine in tuna samples under various conditions of temperature abuse, b) the histamine production of bacteria isolated from the tuna samples used, c) the contribution of each isolate to the total histamine content of the tuna samples studied, d) the ability of six different selective mediums to detect histamine – producing bacteria and the ability of new selective media to differentiate histamine – producing bacteria, and finally e) the cause of a foodborne intoxication attributed to shellfish consumption in Thessaloniki, Greece, in January 2000.

Histamine production and the microbiological quality of tuna fish were evaluated after temperature abuse of tuna loins and steaks. For this purpose tuna steaks and whole tuna fish were used. The fish samples were stored for 7-12 days in three different temperatures (0 – 2°C, 3 – 4°C και 6 – 7°C) and abused for 2 h daily in three different temperatures (20°C, 25°C και 30°C) and histamine and bacteriological analysis was performed.

The bacterial strains isolated from spoiled tuna samples were examined for histamine production and their contribution to histamine production in tuna fish flesh. Six differential plating mediums and broths (Niven agar, Niven broth, Modified Niven agar, Modified Niven broth, Møller decarboxylase agar and Møller decarboxylase broth) were evaluated for their ability to detect histamine producing bacteria. Seventeen new selective media based on the composition of Niven broth were evaluated for the differentiation of histamine – producing



bacteria. These mediums varied on the pH, the tryptone and histidine content and the inclusion of pyridoxal phosphate.

Also an outbreak of a foodborne illness attributed to toxic shellfish consumption affecting 120 persons in Thessaloniki, Greece, in January 2000 was investigated. Mussels' samples harvested from the Thermaikos gulf during the outbreak were examined for diarrhetic shellfish poisoning toxins (DSP toxins). Also samples of mussels harvested from the Thermaikos and Amvrakikos gulf from April 2000 to April 2001 were examined for DSP toxins.

The analysis of the results of the temperature abuse of tuna indicates that 1) histamine concentration in temperature abused tuna is affected by the duration of temperature abuse; high temperatures of abuse have the most profound effect in histamine concentration, indicating that the lower the storing temperatures (lower than 4°C) the safer the tuna fish, 2) deep freezing of tuna slows histamine production, even if tuna is defrosted and stored in fridge temperature 3) histamine production is correlated with the aerobic colony counts at 30°C, the Enterobacteriaceae counts and the coliform counts, 4) Veratox Histamine ELISA is unsuitable for routine screening, 5) *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus hominis* and *Enterococcus hirae* were the most active histamine producing bacteria isolated.

The evaluation of the differential mediums for histamine producing bacteria revealed that: Niven agar is the differential medium most suitable for the detection of histamine producing bacteria. Modified Niven agar and Møller decarboxylase agar were the less suitable for the detection of histamine producing bacteria.

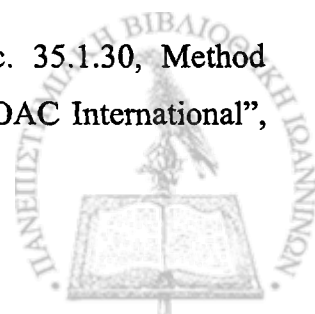
The examination of mussels' samples for the presence of DSP toxins revealed that the Thessaloniki outbreak on January of 2000 was caused by the consumption of mussels containing a lipophilic toxin of the ocadaic acid group of toxins. Lipophilic toxins of the DSP toxins were detected in small concentrations from mussels harvested in March 2001 from the Thermaikos gulf. Also, lipophilic DSP toxins were detected in small concentrations from mussels harvested in January 2001 from the Amvrakikos gulf.



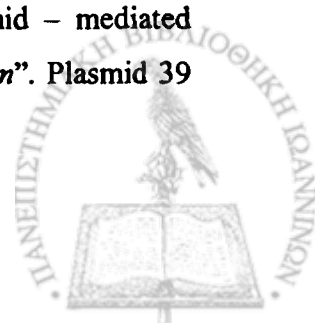
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΔΙΕΘΝΗΣ

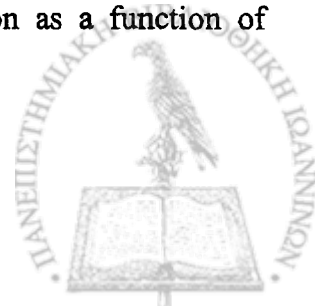
1. Aase B., Rogstad A. (1997). "Optimization of sample cleanup procedure for determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins by use of experimental design". J Chromatogr A 764 (2), 223 – 231.
2. Ababouch L., Afilal M.E. (1986). "A survey of histamine levels in commercially processed fish in Morocco". Proceedings of the 2nd World Congress on Food Infections and Intoxications, Berlin 26 – 30 May 1986, 254 – 257.
3. Ababouch L., Alaoui M.M., Busta F.F. (1986). "Histamine levels in commercially processed fish in Morocco". J Food Prot 49 (11): 904 – 908.
4. Ababouch L., Afilal M.E., Rhafiri S., Busta F.F. (1991). "Identification of histamine – producing bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperatures (25°C)". Food Microbiol 8, 127 – 136.
5. Ababouch L. (1997). "Application of the HACCP principles in the fish-canning industry in Morocco". In: Martin R.E., Collette R.L., Slavin J.W. (eds.), "Fish Inspection, Quality Control, and HACCP: A Global Focus", Proceedings of the Conference held 19–24 May 1996, Arlington, VA, Technomic, Lancaster, Basel, pp 302 – 310.
6. Actis L.A., Smoot J., Barancin C.E., Findlay R.H. (1999). "Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria". J Microbiol Meth 39, 79 – 90.
7. Aiiiso K. (1954). "On the samma – sakuraboshi poisoning." Shinryo Shitsu 6, 44.
8. Alloca A., Spiridigliozzi S., Tupini P.G. (1986). "Episodi di intossicazione istamino – simile osservati nel Comune di Roma nel decennio 1970 – 1979". La Rivista della Società Italiana dell' Scienza dell' Alimentazione 15 (3), 139 – 142.
9. Andersen E.M. (1997). "Quality assurance on board fishing vessels". In: Martin R.E., Collette R.L., Slavin J.W. (eds.), "Fish Inspection, Quality Control, and HACCP: A Global Focus". Proceedings of the Conference held 19 – 24 May 1996, Arlington, VA, Technomic, Lancaster, Basel, pp. 427 – 436.
10. AOAC (1995a). "Histamine in seafood: Biological method. Sec. 35.1.30, Method 945.04". In: Cunniff PA (ed.) "Official Methods of Analysis of AOAC International", 16th ed., AOAC International, Gaithersburg MD, pp. 16 – 17.



11. AOAC (1995b). "Histamine in seafood: Chemical method. Sec. 35.1.31, Method 957.07". In: Cunniff PA (ed.) "Official Methods of Analysis of AOAC International", 16th ed., AOAC International, Gaithersburg MD, pp. 16 – 17.
12. AOAC (1995c). "Histamine in seafood: Fluorometric method. Sec. 35.1.32, Method 977.13". In: Cunniff PA (ed.) "Official Methods of Analysis of AOAC International", 16th ed., AOAC International, Gaithersburg MD, pp. 16 – 17.
13. Arnold S.H., Brown W.D. (1978). "Histamine toxicity from fish products". *Adv Food Res* 34, 113 – 154.
14. Ash A.S.F., Schild H.O. (1966) "Receptors mediating some actions of histamine". *Br J Pharmacology*, 27: 427 – 439.
15. Ashbolt R., Givney R., Gregory J.E., Hall G., Hundy R., Kirk M., McKay I., Meuleners L., Millard G., Raupach J., Roche P., Prasopa-Plaizier N., Sarna M.K., Stafford R., Tomaska N., Unicomb L., Williams C. (2002). "Enhancing foodborne disease surveillance across Australia in 2001: the OzFoodNet Working Group". *Communicable Diseases Intelligence* 26 (3), 375 – 406.
16. Ashbolt R., Givney R., Gregory J.E., Hall G., Hundy R., Kirk M., McKay I., Meuleners L., Millard G., Raupach J., Roche P., Prasopa-Plaizier N., Sarna M.K., Stafford R., Tomaska N., Unicomb L., Williams C. (2004). "OzFoodNet: enhancing foodborne disease surveillance across Australia: quarterly report, 1 October to 31 December 2003". *Communicable Diseases Intelligence* 28 (1), 86 – 89.
17. Atlas R.M. (1995). "Microbiological Media for the Examination of Food". CRC Press, Inc.
18. Aune T., Yndestad M. (1993). "Chapter 5. Diarrhetic shellfish poisoning". In: Falconer I.R. (ed.). "Algal Toxins in Seafood and Drinking Water". Academic Press, London, pp. 87 – 104.
19. Babe K.S., Serafin W.E. (1996). "25. Histamine, bradykinine, and their antagonists". In: Sanford Goodman L., Limbird L.E., Milinoff P.B., Ruddon R.W., Goodman Gilman A (eds.): "Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics". McGraw-Hill, pp. 581 – 600 .
20. Baccelli G., Durante F. (1910). "Contributo allo studio dell' ictiosismo". *Il Policlinico* 17, 24 – 32.
21. Barancin C.E., Smoot J.C., Findlay R.H., Actis L.A. (1998). "Plasmid – mediated histamine biosynthesis in the bacterial fish pathogen *Vibrio anguillarum*". *Plasmid* 39 (3), 235 – 244.



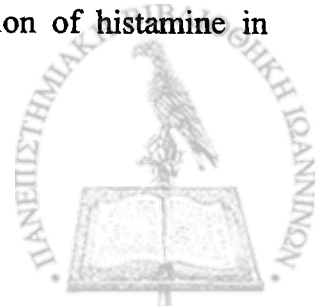
22. Baranowski J.D. (1985a). "Low – temperature production of urocanic acid by spoilage bacteria isolated from Mahimahi (*Coryphaena hippurus*)". Appl Environ Microbiol 50, 546 – 547.
23. Baranowski J. (1985b). "III. Methodology for histamine analysis". In: Sun Pan B., James D. (eds.). "Histamine for marine products: production by bacteria, measurement and prediction of formation" FAO Fisheries Technical Paper 252, FIIU/T252, Rome, pp. 4 – 9.
24. Baranowski J., Frank H., Brust P., Chongsiriwatana M., Premaratne R. (1990) "Decomposition and histamine content in Mahimahi (*Coryphaena hippurus*)". J Food Prot 53, 217 – 222.
25. Barocelli E., Ballabeni V. (2003). "Histamine in the control of gastric acid: A topic review". Pharmacol Res 47, 299 – 304.
26. Bartholomew B.A., Berry P.R., Rodhouse J.C., Gilbert R.J. (1987). "Scombrototoxic fish poisoning in Britain: features of over 250 suspected incidents from 1976 to 1986". Epidem Inf 99, 775 – 782.
27. Bartram P.K. (1997a). "Proper processing and handling of raw tuna". In: Martin R.E., Collette R.L., Slavin J.W. (eds.), "Fish Inspection, Quality Control, and HACCP: A Global Focus". Proceedings of the Conference held 19 – 24 May 1996, Arlington, VA, Technomic, Lancaster, Basel, pp. 233 – 237.
28. Bartram P.K. (1997b). "Proper shipboard handling of fresh tuna for the sashimi market". In: Martin R.E., Collette R.L., Slavin J.W. (eds.), "Fish Inspection, Quality Control, and HACCP: A Global Focus". Proceedings of the Conference held 19 – 24 May 1996, Arlington, VA, Technomic, Lancaster, Basel, pp. 448 – 457.
29. Bateman R.C., Eldrige D.B., Wade S., McCoy J., Messer J., Jester E.L.E., Mowdy D.E. (1994). "Copper chelation assay for histamine in tuna". J Food Sci 59 (3), 517 – 518, 543.
30. Bean N.H., Griffin P., Goulding J., Ivey C. (1990). "Foodborne Disease Outbreaks, 5-Year Summary, 1983-1987". MMWR March 01, 39 (SS1), 15 – 23.
31. Becker K., Southwick K., Reardon J., Berg R., MacCormack N. (2001). "Histamine poisoning associated with eating tuna burgers". JAMA 285 (10), 1327 – 1330.
32. Behling A.R., Taylor S.L. (1982). "Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation". J Food Sci 59 (3), 517 – 518.



33. Ben-Gigirey B.J.M., de Sousa V.B., Villa T.G., Barros-Velasquez J. (1999). "Histamine and cadaverine formation by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*)". *J Food Prot*, 62(8): 933 – 939.
34. Bennour M., El Marrakchi A., Bouchriti N., Hamama A., El Quadaa M. (1991). "Chemical and microbiological assessments of mackerel (*Scomber scombrus*) stored in ice". *J Food Prot* 54 (10), 789 – 792.
35. Bjeldanes L.F., Schutz D.E., Morris M.M. (1978). "On the aetiology of scombroid poisoning: cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea pig". *Food Cosmetic Toxicol* 16 (2), 157 – 159.
36. Billon J. (1978). "Intoxication alimentaires d' origine histaminique". *RTVA* 143, 1 – 4.
37. Blacwell J.W., Duncan W.A.M., Durant C.J., Ganellin C.R., Parsons E.M. (1972). "Definition and antagonism of histamine H₂ – receptors". *Nature*, 236: 385 – 390.
38. Boni L., Mancini L., Milandri A., Poletti R., Pompei M., Viviani R. (1990). "First cases of DSP in the Northern Adriatic Sea". International Conference Regione Emilia Romagna. Bologna (Italy), 21 – 24 March.
39. Borysiewicz L., Krikler D. (1981). "Sombrotoxic atrial flutter". *Br Med J* 282 (6274), 1434.
40. Boutin J.P., Puyhardy J.M., Chianea D., Andreu P., Paez S., Fize L., Vauthier J.M., Chapalain J.C., Gripari J.L., Corbe H., Bietrix P. (1997). "A propos d' une toxo – infection alimentaire collective (TIAC) a l' histamine survenue a Brest". *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 25, 116 – 117.
41. Boutin J. P., Puyhardy J. M., Chianea D., Andreu P., Paez S., Fize L., Vauthier J. M., Chapalain J. C., Gripari J. L., Corbe H., Bietrix P. (1998). "Les intoxications alimentaires histaminiques". *Santé publique* 10 (1), 29 – 37.
42. Bover – Cid S., Holzapfel W.H. (1999). "Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria". *Int J Food Microbiol* 53, 33 – 41.
43. Bowmer E.J., Fung C.P.J., Neufeld N., Drew R., Appleton G., Gaunt B. (1979). "Scombroid – like poisoning from eating mahi – mahi imported into Canada – British Columbia". *Can Dis Wkly Rep* 5, 78.
44. Bremer P.J., Fletcher G.C., Osborne C. (2003). "Scombrototoxin in seafood". *Food Crop Res* 1 – 9.
45. Brown C. (1993). "Scombroid poisoning" (Letter). *Méd J Aust* 158 (6), 435 – 436.



46. Brown N.J., Roberts J.L. (2001). "Histamine, Bradykinin, and their Antagonists". In: Hardman J.G., Limbird L., Gilman A.G. (eds.) "Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics". McGraw-Hill Professional, April 2000.
47. Burgess V., Shaw G. (2001). "Pectenotoxins — an issue for public health. A review of their comparative toxicology and metabolism". *Environ Int* 27 (2001) 275 – 283.
48. Caroppo C., Congestri R., Bruno M. (2001). "Dynamics of *Dynophysis sensu lato* species (Dinophyceae) in a coastal Mediterranean environment (Adriatic Sea)". *Continental Shelf Research* 21, 834 – 1854.
49. Centers for Disease Control and Prevention (1990). CDC Surveillance Summaries, October 25, 1996. *MMWR* 45 (No. SS-5).
50. Centers for Disease Control and Prevention (2000). CDC Surveillance Summaries, March 17, 2000. *MMWR* 49 (No. SS-1).
51. Centers for Disease Control and Prevention (2003a). "1998 Foodborne Diseases Outbreaks Due to Chemical Etiologies". (http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo1998/chemical98.htm, updated 6/3/2003).
52. Centers for Disease Control and Prevention (2003b). "1999 Foodborne Diseases Outbreaks Due to Chemical Etiologies". (http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo1999/chemical99.htm, updated 6/3/2003).
53. Centers for Disease Control and Prevention (2003c). "2000 Foodborne Diseases Outbreaks Due to Chemical Etiologies". (http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo2000/chemical00.htm, updated 6/3/2003).
54. Centers for Disease Control and Prevention (2003d). "2001 Foodborne Diseases Outbreaks Due to Chemical Etiologies". (http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo2001/chemical01.htm, updated 6/3/2003).
55. Centers for Disease Control and Prevention (2004). "2002 Foodborne Diseases Outbreaks Due to Chemical Etiologies". (http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo2002/chemical02.htm, updated 28/6/2004).
56. Chamberlain M. (2001). "Histamine levels in longlined tuna in Fiji: A comparison of samples from two different body sites and the effect of storage at different temperatures". *S Pac J Nat Sci* 19, 30 – 34.
57. Chambers T., Staruskiewicz W. (1978). Fluorometric determination of histamine in cheese". *J AOAC* 61 (5), 1092 – 1096.



58. Chen C. -M., Wei C.I., Koburger J.A., Marshall M.R. (1989). "Comparison of four agar media for detection of histamine - producing bacteria in tuna". *J Food Prot* 52 (11), 808 - 813.
59. Chevrier D., Guesdon J. -L., Mazié J. -C., Avrameas S. (1986). "Enzyme immunoassay for the measurement of histamine". *J Immunol Meth* 94, 119 - 125.
60. Chin K.W., Garriga M.M., Metcalfe D.D. (1989). "The histamine content of oriental food". *Food Chem Toxicol* 27 (5), 283 - 287.
61. Choudhury N., Hansen W., Engesser D., Hammes W.P., Holzapel W.H. (1990). "Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase medium". *Lett Appl Microbiol* 11, 278 - 281.
62. Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Poletti R., Satake M., Viviani R., Yasumoto T. (1997). "Yessotoxin in mussels of the Northern Adriatic Sea". *Toxicon* 35, 177 - 183.
63. Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Poletti R., Viviani R. (1998). "Isolation of adriatoxin, a new analogue of yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea". *Tetrahedron Letters*, 39, 8897 - 8900.
64. Clark R.B. (1997). "Scombroid poisoning revisited (Letter)". *Ann Emerg Med* 29 (3), 426 - 427.
65. Clifford M.N, Walker R., Wright J., Hardy R., Murray C.K. (1989). "Studies with volunteers on the role of histamine in suspected scombrototoxicosis". *J Sci Food Agric* 47 (3), 365 - 375.
66. Dack G.M. (1956). "Food poisoning". Rev ed. Univ. Chicago Press, Chicago.
67. Dapkevicius M.L.N., Nout M.J.R., Rombouts F.M., Houben J.H., Wymenga W. (2000). "Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms". *Inter J Food Microbiol*, 57: 107 - 114.
68. Dickinson G. (1982). "Scombroid fish poisoning syndrome". *Ann Emerg Med* 11, 487.
69. Doeglas H.M., Huisman J., Nater J.P. (1967). "Histamine intoxication after cheese". *Lancet* 2, 1361.
70. D'Mello J.P.F. (2003). *Food Safety: Contaminants and Toxins*. CAB International Wallingford, Oxon UK, pp.412-413.
71. Downs M. (1997). "Scombroid poisoning revisited". *Ann Emerg Med* 29 (3), 426 - 427.



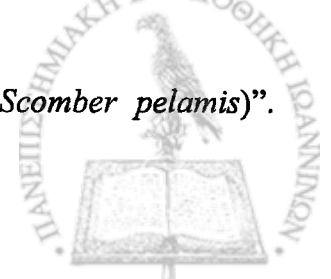
72. Draisci R., Lucentini L., Giannetti L., Boria P., Stacchini A. (1995). "Detection of diarrhoetic shellfish toxins in mussels from Italy by ionspray liquid chromatography - mass spectrometry". *Toxicon* 33 (12), 1591 – 1603.
73. Draisci R., Lucentini L., Giannetti L., Boria P., Poletti P. (1996). "First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe". *Toxicon* 34 (8), 923 – 925.
74. Draisci R., Ferretti E., Palleschi L., Marchiafava C., Poletti R., Milandri A., Ceredi A., Pompei M. (1999). "High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea". *Toxicon* 37, 1187 – 1193.
75. Draisci R., Lucentini L., Mascioni A. (2000) "Pectenotoxins and Yessotoxins: Chemistry, Toxicology, Pharmacology and Analysis". In: Botana L.M. (ed.). "Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection", Marcel – Dekker, New York, pp. 289 – 324.
76. Eitenmiller R.R., Wallis J.W., Orr J.H., Phillips R.D. (1981). "Production of histidine decarboxylase and histamine by *Proteus morgani*". *J Food Prot* 44 (11), 815 – 820.
77. Eitenmiller R.R., Orr J.H., Wallis J.W. (1982). "Histamine formation in fish: microbial and biochemical conditions". In: Martin R.E., Flick G.J., Hebard C.E., Ward D.R. (eds.). "Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products". Avi, Westport, CT, pp. 39 – 50.
78. Fattorusso E., Ciminiello P., Constantino V., Magno S., Mangoni A., Poletti R., Pompei M., Viviani R. (1992). "Okadaic acid in mussels of Adriatic Sea". *Mar Pollut Bull* 24, 234-237.
79. Feldberg W., Schilf E. (1930). "Histamin: Seine Pharmakologie und Bedcutung für die Humoralphysiologie". Julius Springer, Berlin
80. Ferencik M. (1970). "Formation of histamine during bacterial decarboxylation of histidine in the flesh of some marine fish". *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 14, 52 – 60.
81. Fletcher G.C., Summers G., van Veghel P.W.C. (1998). "Levels of histamine and histamine – producing bacteria in smoked fish from New Zealand markets". *J Food Prot* 61 (8), 1064 – 1070.
82. Food Safety Information Bulletin (1999). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food No.112. London, UK.
83. Food Standards Agency (2000a). Food Standards Agency News No.2. London, UK.
84. Food Standards Agency (2000b). Food Standards Agency News No.3. London, UK.



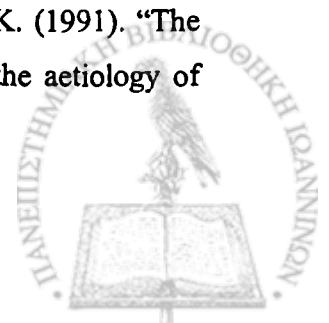
85. Food Standards Agency (2001a). Food Standards Agency News No.4. London, UK.
86. Food Standards Agency (2001b). Food Standards Agency News No.5. London, UK.
87. Food Standards Agency (2001c). Food Standards Agency News No.7. London, UK.
88. Food Standards Agency (2001d). Food Standards Agency News No.10. London, UK.
89. Food Standards Agency (2001e). Food Standards Agency News No.11. London, UK.
90. Food Standards Agency (2001f). Food Standards Agency News No.12. London, UK.
91. Food Standards Agency (2001g). Food Standards Agency News No.13. London, UK.
92. Food Standards Agency (2001h). Food Standards Agency News No.14. London, UK.
93. Food Standards Agency (2002). Food Survey Information Sheet No.21/02. London, UK.
94. Frank H., Yoshinaga D. (1987). "Table for estimating histamine formation in skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, at low nonfreezing temperatures". Mar Fish Rev. 49 (4), 67 – 70.
95. Frank H.A., Yoshinaga D.H., Nip W.K. (1981). "Histamine formation and honeycombing during decomposition of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, at elevated temperatures. Mar Fish Rev 43 (10), 9 – 14.
96. Frank H.A., Baranowski, J.D. (1984). "Authentic fishery product samples, collected and decomposed under controlled conditions". Contract 223-80-2295. US Department of Health and Human Services, Washington, DC.
97. Frank H.A., Baranowski J.D., Chongiriwatana M., Brust P.A., Premaratne R.J. (1985). "Identification and decarboxylase activities of bacteria isolated from decomposed mahimahi (*Coryphaena hippurus*) after incubation at 0 and 32°C". Int J Food Microbiol 2, 331 – 340.
98. Fujii T., Kurihara K., Okuzumi M. (1994). "Viability and histidine decarboxylase activity of halophilic histamine – forming bacteria during frozen storage". J Food Prot 57, 611 – 613.
99. Ganellin C.R., Parsons M.E. (eds.) (1982). "Pharmacology of Histamine Receptors". PSG, Bristol.
100. Geiger E. (1944). "Histamine content of processed and uncanned fish. A tentative method of quantitative determination of spoilage". Food Res 9, 293 – 297.
101. Geiger E. (1955). "Role of histamine in poisoning with spoiled fish". Science 121 (3155), 865 – 866.



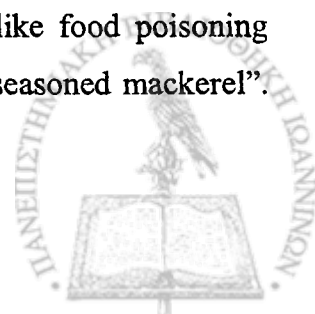
102. Gestal – Otero J.J. (2000). “Nonneurotoxic toxins”. In: Botana, LM (Ed.). “Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection”. Marcel Dekker, New York, pp. 45 – 64.
103. Gilbert R.J., Hobbs G., Murray C.K., Cruickshank J.G., Young S. (1980). “Scombrototoxic fish poisoning: features of the first 50 incidents to be reported in Britain (1976 – 9)”. Brit Med J 281, 71 – 72.
104. Gram L., Huss H. (1996). “Microbiological spoilage of fish and fish products”. Int J Food Microbiol 33, 121 – 137.
105. Granerus G. (1968). “Effects of oral histamine, histidine and diet on urinary excretion of histamine, methylhistamine and 1-methyl-4-imidazolacetic acid in man”. Scand J Clin Lab Invest 22 (Suppl. 104), 49 – 58.
106. Guesdon J.L., Chevrier D., Mazié J.C., David B., Avrameas S. (1986). “Monoclonal anti – histamine antibody”. J Immunol Meth 87, 69 – 78.
107. Guggenheim M. (1951). “Die Biogenen Amine”. 4th Ed, S. Karger, Basel.
108. Guizani N., Al-Busaidy M.A., Al-Belushi I.M., Mothershaw A., Rahman M.S. (2005). “The effect of storage temperature on histamine production and the freshness of yellow.n tuna (*Thunnus albacares*)”. Food Res Int 38, 215 – 222.
109. Guss D.A. (1998). “Scombroid fish poisoning: successful treatment with cimetidine”. Undersea Hyperb Med 25 (2), 123 – 125.
110. Hallegraef G.M. (1997). “Algal toxins in Australian shellfish”. In: Hocking A.D., Arnold G., Jenson I., Newton K., Sutherland P. (eds.). “Foodborne Microorganisms of Public Health Significance”. AIFST (NSW branch), 5th Edition, Sydney, pp. 561 – 571.
111. Halstead B. (1967). “Scombrototoxic fish”. In: “Poisonous and Venomous Marine Animals of the World, Vol.2 – Verterbrates”. U.S. Government Printing Office, Washington D.C., pp. 639 – 668.
112. Hardy R., Smith J.G.M. (1976). “The storage of mackerel (*Scomber scombrus*). Development of histamine and rancidity”. J Sci Food Agric 27, 595 – 599.
113. Hart P.H., Jaksic A., Swift G., Norval A., Ell – Ghorr A.A., Finlay – Jones J.J. (1997). “Histamine involvemenet in UVB– and *cis* – urocanic acid – induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses”. Immunology 91, 601 – 608.
114. Havelka B. (1967). “Role of the *Hafnia* bacteria in the rise of histamine in tuna fish meat”. Cesk Hyg 12, 343 – 52. In: Chem Abstr 68, 21019 (1968).
115. Henderson P.B. (1830). “Case of poisoning from the bonito (*Scomber pelamis*)”. Edinburgh Med J 34, 317 – 318.



116. Hernández – Herrero M., Roig – Sagués A., Rodríguez – Jerez J., Mora – Ventura T. (1999). “Halotolerant and halophilic histamine – forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*)”. *J Food Prot* 62 (5), 509 – 514.
117. Higashijima T., Uzu S., Nakajima T., Ross E.M. (1988). “Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP – binding regulatory proteins (G proteins)”. *J Biol Chem*, 263: 6491 – 6494.
118. Hokama Y., Scheuer P.J., Yasumoto T. (1989). “Effect of a marine toxin on human peripheral blood monocytes”. *J Clin Lab Anal* 3, 215 – 221.
119. Hokama Y., Smith M. (1990). “Review: Immunological assessment of marine toxins”. *Food Agric Immunol* 2, 99 – 105.
120. Holt J., Krieg N., Sneath P., Staley J., Williams S. (eds.) (1995). “Bergey’s manual of determinative bacteriology”. Williams & Wilkins, Baltimore USA, 9th ed.
121. Hui J., Taylor S.L. (1983). “High pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in foods”. *J AOAC Int* 66 (4), 853 – 857.
122. Hui J., Taylor S.L. (1985). “Inhibition of *in vivo* histamine metabolism in rats by foodborne and pharmacologic inhibitors of diamine oxidase, histamine – *N* – methyltransferase, and monoaminoxidase”. *Toxicol Appl Pharmacol* 81, 241 – 249.
123. Hungerford J.M., Walker K.D., Wekell M.M., LaRose J.E., Throm H.R. (1990). “Selective determination of histamine by flow injection analysis”. *Anal Chem* 62 (18), 1971 – 1976.
124. 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”. *Anal Chim Acta* 438 (1 – 2), 123 – 129.
125. Huss H.H. (1995). Assurance of seafood quality. FAO Fisheries Technical Paper No.334, FAO, Rome, Italy.
126. Huss H.H. (1997). Control of Indigenous Pathogenic Bacteria in Seafood. In: Martin R.E., Collete R.L., Slavin J.W. (eds) Proceedings of the Conference “Fish Inspection, Quality Control and HACCP: a global focus”. May 19-24, Arlington, Virginia, USA pp.163-180.
127. Igarashi T. (1939). “The pungent principles of fish produced by decrease in freshness, Part II”. *Bull Japan Soc Sci Fish* 8, 158 – 160.
128. Ijomah P., Clifford M.N., Walker R., Wright J., Hardy R., Murray C.K. (1991). “The importance of endogenous histamine relative to dietary histamine in the aetiology of scombrototoxicosis”. *Food Addit Contam* 8 (4), 531 – 542.



129. Irvine W.T., Duthie H.L., Ritchie H.D., Waton N.G. (1959). "Urinary output of histamine after a meat meal". *Lancet* 1, 1061.
130. James K.J., Carmody E.P., Gillman M., Kelly S., Draisci R., Lucentini L., Giannetti L. (1997). "Identification of a new diarrhoeic toxin in shellfish using liquid chromatography with fluorimetric and mass spectrometric detection". *Toxicon* 35 (6), 973 – 978.
131. James K., Bishop A., Carmody E., Kelly S. (2000). "Detection Methods for Okadaic Acid and Analogues". In: Botana L.M. (ed.). "Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection". Marcel Dekker, New York, pp. 217 – 238.
132. Johnson L.R., Overholt B.F. (1967). "Release of histamine into gastric venous blood flow following injury by acetic or salicylic acid". *Gastroenterology* 52, 505 – 509.
133. Joosten H.M.L.J., Northolt M.D. (1989). "Detection, growth and amine – producing capacity of lactobacilli in cheese". *Appl Environ Microbiol* 55, 2356 – 2359..
134. Kahana L.M., Todd E. (1981). "Histamine poisoning in a patient on isoniazide". *Canada Diseases Wkly Rpt* 7, 117 – 118.
135. Kalač P., Savel J., Krizek M., Pelikanova T., Prokopova M. (2002). "Biogenic amine formation in bottled beer". *Food Chemistry* 79 (2002) 431 – 434.
136. Kanki M., Yoda T., Tsukamoto T., Shibata T. (2002). "*Klebsiella pneumoniae* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers". *Appl Environ Microbiol* 68 (7), 3462 – 3466.
137. Karunasagar I., Segar K., Karunasagar I. (1989). "Incidence of DSP and DSP in shellfish along the coast of Karnataka state (India)". In: Okaichi T., Anderson D.M., Nemoto T. (eds.). "Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology". Elsevier, Amsterdam, pp. 61 – 64.
138. Kawabata T. (1962). "Problems involved in the research on fish and shellfish poisonings". *Japan J Med Sci Biol* 17, 141 – 143.
139. Kawabata, T., Ishizaka, K., Miura, T., (1955). "Studies on the allergy-like food poisoning associated with putrefaction of marine products. II. Separation of causative substance some of its chemical characteristics". *Jpn J Med Sci Biol.* 8, 503 – 519.
140. Kawabata T., Ishizak K., Miura T. (1956). "Studies on the food poisoning associated with putrefaction of marine products. I. Outbreaks of allergy – like food poisoning caused by "samma sakuraboshi" (dried season saury) and canned seasoned mackerel". *Bull Japan Soc Sci Fish* 21 (5), 335 – 340.



141. Kawabata T. (1989). "Regulatory aspects of marine biotoxins in Japan". In: Natori S., Hashimoto K., Ueno Y. (eds.). "Mycotoxins and Phycotoxins 88: A Collection of Invited Papers Presented at the Seventh International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins". Elsevier, Amsterdam, pp. 469 – 476.
142. Kim R. (1979). "Flushing syndrome due to mahimahi (scombroid fish) poisoning". Arch Dermatol 115, 963 – 965.
143. Kim S.H., Price R.J. (1999). "Histamine Formation and Bacterial Spoilage of Albacore Harvested off the U.S. North West Coast". J Food Sci 64 (2), 340 – 343.
144. Kimata M. (1961). "The histamine problem". In: Borgstrom G. (ed.) "Fish as Food" Academic Press, New York, 1, pp. 329 – 352.
145. Klaussen N.K., Huss H.H. (1987). "Growth and histamine production by *Morganella morganii* under various temperature conditions". Int J Food Microbiol 5, 147 – 156.
146. Knox G. (1888). "Poisonous fishes and means of prevention of cases of poisoning by them". Voenna – Med Zh 161 (3), 399 – 464.
147. Konovalova G.V. (1991). "Toxic and potentially toxic dinoflagellates from the far east coastal water of the USSR". In: Smayda T.J., Shimizu Y. (eds.). "Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea; Proceedings 5th International conference on Toxic Marine Phytoplankton, Newport (USA)". Elsevier, Amsterdam, pp. 275 – 279.
148. Kossel H. (1896). "Uber die basischen stoffe des zellkerns". Hoppe – Scylers Z Physiol Chem 22, 176 – 187.
149. Koukaras K., Nikolaidis G. (2002). "Intense DSP outbreak associated with a Dinophysis bloom in Thermaikos Gulf (N.W. Aegean Sea, Greece)". Harmful Algae News, 23, 8.
150. Krogh P., Edler L., Graneli E. (1985). "Outbreaks of diarrhetic shellfish poisoning on the west coast of Sweden". In: Anderson D.M., White A.W., Baden D.G. (eds.). "Toxic Dinoflagellates". Elsevier, Amsterdam, pp. 501 – 504.
151. Kumagai M., Yanagi T., Murata M., Yasumoto T., Kat M., Lassus R., Rodriguez – Vazquez J.A. (1986). "Okadaic acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe". Agric Biol Chem 50, 2853 – 2857.
152. Lagunoff D., Martin T.W., Read G. (1983). "Agents that release histamine from mast cells". Annu Rev Pharmacol Toxicol, 23: 331 – 351.
153. Lapa – Guimarães J., Pickova J. (2004). "New solvent systems for thin – layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid". J Chromatogr A 1045, 223 – 232.



154. Leask A., Yankos P., Ferson M.J. (2004). "Fish, so foul! Foodborne illness caused by combined fish histamine and wax ester poisoning". *Commun Dis Intell* 28, 83 – 85.
155. Lee J.-S., Yanagi T., Kenma R., Yasumoto T. (1987). "Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins by high – performance liquid chromatography". *Agric Biol Chem* 51, 877 – 881.
156. Lee J.-S., Igarashi T., Fraga S., Dahl E., Hovgaard P., T. Yasumoto (1989). "Determination of diarrhetic toxins in various dinoflagellate species". *J Appl Phycol* 1, 147-152.
157. Legroux R., Levaditi J.C., Boudin G., Bovet D. (1946). "Intoxications histaminiques collectives consécutives à l' ingestion de thon frais". *Presse Méd* 29, 545.
158. Lehane L., Olley J. (1999). Histamine (Scombroid) Fish Poisoning: a review in a risk-assessment framework. National Office of animal and plant health, Canberra, Australia.
159. Lehane L., Olley J. (2000). "Histamine fish poisoning revisited". *Int J Food Microbiol* 58, 1 – 37.
160. Lerke P.A., Bell L.D. (1976). "A rapid fluorometric method for the determination of histamine in canned tuna". *J Food Sci* 41, 1282 – 1284.
161. Lerke P., Werner B., Taylor S., Guthertz L. (1978). "Scombroid poisoning; Report of an outbreak". *West J Med* 129 (5), 381 – 386.
162. Lerke P., Porcuna M., Chin H. (1983). "Screening test for histamine in fish". *J Food Sci* 48, 155 – 157.
163. Lessie T.G., Niedhardt F.C. (1967). "Formation and operation of the histidine-degrading pathway in *Pseudomonas aeruginosa*". *J. Bacteriol.* 93, 1800 – 1810.
164. Leurs R., Smit M.J., Timmerman H.G. (1995). "Molecular pharmacological aspects of histamine receptors". *Pharmac Ther*, 3: 413 – 463.
165. Levy H. (2002). "Histidinemia". In: Wendel U. (ed.): "Orphanet Encyclopedia". <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-HIS.pdf>.
166. Lin J.S., Baranowski J.D., Olcott A. (1977). "Rapid thin – layer chromatographic densitometric determination of histamine in tuna". *J Chromatogr* 130, 426 – 430.
167. Lipp E.K., Rose J.B. (1997). "The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America". *Rev Sci Technol* 16 (2), 620 – 640.
168. Lonvaud-Funel A. (2001). "Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria". *FEMS Microbiol Lett* 199, 9 – 13.
169. López – Sabater E.I., Rodríguez – Jerez J.J., Hernández – Herrero M., Mora – Ventura M.T. (1994). "Bacteriological quality of tuna fish (*Thynnus thynnus*) destined for

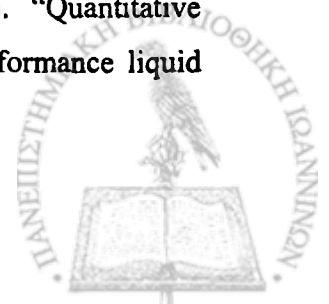
- canning: effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level". *J Food Prot* 57 (4), 318 – 323.
170. López – Sabater E.I., Rodríguez – Jerez J.J., Hernández-Herrero M., Roig – Sagués A.X., Mora – Ventura M.T. (1996). "Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*)". *J Food Prot* 57 (2), 167 – 174.
 171. Love R.M. (1980). "Histidine". In: "The Chemical Biology of Fishes, Vol 2: Advances 1968 – 77". Academic Press, London.
 172. Lund B.M., Baird-Parker T.C., Gould G.M. (2000). *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA.
 173. Lyons D.E., Beery J.T., Lyons S.A., Taylor S.L. (1983). "Cadaverine and aminoguanidine potentiate the uptake of histamine in vitro in perfused intestinal segments of rats". *Toxicol Appl Pharmacol* 70, 445 – 458.
 174. Mackie I.M., Ritchie A.H. (1974). "Free amino acids of fish flesh". *Proc Int Congr Food Sci Technol* 4 (1), 29 – 38.
 175. Magasanik B., Bowser H.R. (1955). "The degradation of histidine by *Aerobacter aerogenes*". *J. Biol. Chem.* 213, 571 – 580.
 176. Maher J.P., Worth J.A., Arvay J., Raum K., Iampetro L., Welte J.R. (2000). "Scombroid Fish Poisoning --- Pennsylvania, 1998". *MMWR Weekly* May 49 (18), 398 – 400.
 177. Maijala R. (1993). "Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and Modified decarboxylation agar". *Lett Appl Microbiol* 17, 40 – 43.
 178. Malle P., Vallé M. (1996). "Assay for biogenic amines involved in fish decomposition". *J AOAC Int* 79 (1), 43 – 49.
 179. Marcaci A. (1891). "Sour le pouvoir toxique du sang de thon". *Arch Ital Biol* 16, i.
 180. Markoff W.N. (1939). "Zum problem der seefisch – fäulnis". *Zentr Bakteriol Parasitenk, Abt II*, 101, 157 – 171.
 181. Markov S. (1943). "Seefischvergiftung". *Wien Med Worschr* 93 (26 – 27), 388.
 182. Masselin P., Lassus P., Bardouil M. (1992). "High performance liquid chromatography analysis of diarrhetic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast". *J Appl Phycol* 4, 385-389.
 183. Matias W.G., Traore A., Creppy E.E. (1999). "Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome". *Hum Exper Toxicol* 18, 345 – 350.
 184. Mayer K., Pause D. (1972). "Biogene amine in Sauerkraut". *Lebensm – Wiss Technol* 5, 108.



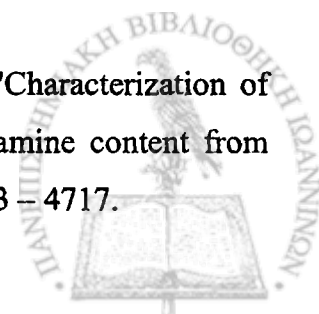
185. McClane B. (1997). "*Clostridium perfringens*". In: Doyle M.P., Beauchat L.R., Montville T.J. (editors). "Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers". ASM Press, Washington D.C., pp. 305 – 326.
186. McInerney J., Sahgal P., Vogel M., Rahn E., Jonas E. (1996). "Scombroid poisoning". *Ann Emerg Med* 28 (2), 235 – 238.
187. Medina M.A., Quesada A.R., de Castro I.N., Sanchez-Jimenez P. (1999). "Histamine, Polyamines, and Cancer". *Biochem Pharmacol* 57, 1341 – 1344.
188. Middlebrooks B.L., Toom P.M., Douglas W.L., Harisson R.E., McDowell J. (1988). "Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in spanish mackerel (*Scomberomus maculatus*)". *J Food Sci* 53 (4), 1024 – 1029.
189. Mietz J.L., Karmas E. (1978). "Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition". *J AOAC Int* 61 (1), 139 – 145.
190. Mitchell J. (1993). "Scombrototoxic fish poisoning". Report for the Ministry of Health, Wellington.
191. Mitchell R.G., Code C.F. (1954). "Effect of diet on urinary excretion of histamine". *J Appl Physiol* 6, 387 – 391.
192. Møeller V. (1954). "Distribution of amino acid decarboxylase in *Enterobacteriaceae*". *Acta Pathol Microbiol Scand* 35, 259 – 277.
193. Mongar J.L. (1957). "Effect of chain length of aliphatic amines on histamine potentiation and release". *Br J Pharmacol* 1957 12 (2), 140 – 148.
194. Mopper B., Sciacchitano C.J. (1993). "Capillary zone electrophoretic determination of histamine in fish". *J AOAC Int* 77 (4), 881 – 883.
195. Morii H., Cann D.C., Taylor L.Y., Murray C.K. (1986). "Formation of histamine by luminous bacteria isolated from scombroid fish". *Bull Jpn Soc Sci Fish* 52, 2135 – 2141.
196. Moreno-Arribas M., Polo C., Jorganes F., Munoz R. (2003). "Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine". *Intern J Food Microbiol* 84, 117 – 123
197. Morono A., Arevalo F., Fernandez M.L., Maneiro J., Pazos Y., Salgado C., Blanco J. (2002). "Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*". *Aquatic Toxicology* 62, 269 – 280.



198. Morrow J.D., Margoles G.R., Rowland J., Roberts L.J. (1991). "Evidence that histamine is the causative toxin of scombroid-fish poisoning". *New Engl J Med* 324 (11), 716 – 720.
199. Morton S.L., Faust M.A. (1997). "Survey of toxic epiphytic dinoflagellates from the Belizean barrier reef ecosystem". *Bull Mar Sci* 61, 899-906.
200. Morton S.L., Moeller P.D.R., Young K.A., Lanoue B. (1998). "Okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum* isolated from the Belizean coral reef ecosystems". *Toxicon* 36, 201-206
201. Motil K.J., Scrimshaw N.S. (1979). "The role of exogenous histamine in scombroid poisoning". *Toxicol Lett* 3, 219 – 223.
202. Müller G.J., Lamprecht J.H., Barnes J.M., de Villiers R.V.P., Honeth B.R., Hoffman B.A. (1992). "Scombroid poisoning. Case series of 10 incidents involving 22 patients". *South Afr Med J* 81(8), 427 – 30.
203. Niven C.F., Jeffrey M.B., Corlett D.A. (1981). "Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria". *Appl Environ Microbiol* 41 (1), 321 – 322.
204. Ohashi M., Nomura F., Suzuki M., Otsuka M., Adachi O., Arakawa N. (1994). "Oxygen-sensor-based simple assay of histamine in fish using purified amine oxidase". *J Food Sci* 59 (3), 519 – 522.
205. Olley J., Baranowski J. (1985). "V. Temperature effects on histamine formation". In: Pan B.S., James D. (eds.): "Histamine Formation in Marine Products: Production by Bacteria, Measurement and Prediction of Formation". FAO Fisheries Technical Paper No. 252, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 14 – 17.
206. Olley J., Orejana F., Pan B.S. (1985). "VII.4. Effect of gutting". In: Pan B.S., James D. (eds.): "Histamine Formation in Marine Products: Production by Bacteria, Measurement and Prediction of Formation". FAO Fisheries Technical Paper No. 252, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 37 – 39.
207. Omura Y., Price R.J., Olcott H.S. (1978). "Histamine – forming bacteria isolated from spoiled skipjack tuna and jack mackerel". *J Food Sci* 43, 1779 – 81.
208. Orejana F.M., και συν. (1983). "Histamine production in iced, smoked/dried frigate mackerel". *J Food Sci Technol* 7 (2), 30 – 38.
209. Ortiz J., Gómez J., Torrent A., Aldavert M., Blanco I. (2000). "Quantitative radioisotopic determination of histidine decarboxylase using high-performance liquid chromatography". *Anal Biochem* 280, 111 – 117.



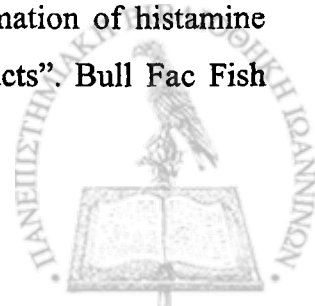
210. Pan B.S. (1985). "VIII.2. Histamine formation in canning processes". In: Pan B.S., James D. (eds.): "Histamine in Marine Products: Production by Bacteria, Measurement and Prediction of Formation". FAO Fish Tech Pap 252, pp. 41 – 44.
211. Pavela – Vranic M., Vestrovic V., Marasova I., Gillman M., Furey A., James K.J. (2002). "DSP toxin profile in the coastal waters of Central Adriatic Sea". *Toxicon* 40, 1601 – 1607.
212. Parrot J., Nickot G. (1966). "Pharmacology of histamine". In: Eichler O., Farah S. (eds.). "Handbook of Experimental Pharmacology". Springer – Verlag, New York, pp. 85 – 90.
213. Pergola M. (1956). "L' ictiovaleno e istamina". *Inst Super Sanita* 19, 419 – 432.
214. Pilsucki R.W., Clayton N.W., Cabelli V.J., Cohen P.S. (1979). "Limitations of the Moeller lysine and ornithine decarboxylase tests". *Appl Environ Microbiol* 37 (2), 254 – 260.
215. Pouchus Y.V., Amzil Z., Marcaillou-Le Baut C., James K., Verbist J.F. (1997). "Specificity of the test based on modification of cell morphology for detection of lipophilic inhibitors of protein phosphatases". *Toxicon* 35 (7), 1137 – 1142.
216. Price R.J. (2004). "Chapter 27: Scombrototoxin (Histamine) Formation". In: *Compendium of Fish and Fishery Product Processes, Hazards, and Controls*. National Seafood HACCP Alliance for Training and Education (<http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/Chapt27.htm> , updated 11/ 11/ 2004).
217. Ramesh A., Venugopalan V.K. (1986). "Densities and characteristics of histamine-forming luminous bacteria of marine fish". *Food Microbiol* 3, 103 – 105.
218. Roberts D., Hooper D., Greenwood M. (1995). "Practical Food Microbiology". Public Health Laboratory Service, London.
219. Rodriguez – Jerez J.J., Ausilia Grassi M., Civera T. (1994a). A modification of lerke enzymic test for histamine quantification". *J Food Prot* 57 (11), 1019 – 1021.
220. Rodriguez – Jerez J.J., López – Sabater E.I., Roig – Sagues A.Z., Mora – Ventura M.T. (1994b). "Histamine, cadaverine and putrescine forming bacteria from ripened spanish semipreserved anchovies". *J Food Prot* 59 (5), 998 – 1001.
221. Rogers P.L., Staruszkiewicz W.F. (2000). "histamine test kit comparison". *J Aq Food Prod Technol* 9 (2), 5 – 17.
222. Romero R., Sanchez - Vinas M., Gazquez D., Bagur G. (2002). "Characterization of selected spanish table wine samples according to their biogenic amine content from liquid chromatographic determination". *J Agric Food Chem* 50, 4713 – 4717.



223. Rossini G.P. (2000). "Neoplastic activity of DSP toxins: The effects of ocaidaic acid and related compounds on cell proliferation: Tumor promotion or induction of apoptosis?". In: Botana L.M. (ed.). "Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection". Marcel Dekker, New York, pp. 257 – 287.
224. Sabroe R.A., Kobza Black A. (1998). "Scombrototoxic fish poisoning". *Clinic Exper Dermatol* 23, 258 – 259.
225. Sánchez – Guerrero I.M., Vidal J.B., Escudero A.I. (1997). "Scombroid fish poisoning: a potentially life – threatening allergic – like reaction". *J Allergy Clin Immunol* 100 (3), 433 – 434.
226. Schulze V.K., Reusse U., Tillack J. (1979). "Lebensmittelvergiftung durch Histamin in fisch und fischzubereitungen". *Arch Lebensmittelhyg* 30, 56.
227. Schutz D.E., Chang G.W., Bjeldanes L.F. (1976). "Rapid thin layer chromatographic method for the detection of histamine in fish products". *J AOAC Int* 59, 1224 – 1225.
228. Scoging A.C. (1991), "Illness associated with seafood". *Commun Dis Rep* 1 (R11), R117 – R122.
229. Scoging A.C. (1998), "Scombrototoxic (histamine) fish poisoning in the United Kingdom: 1987 to 1996". *Commun Dis Public Health* 1 (3), 204 – 205.
230. Senanayake N., Vyravanathan S. (1981). "Histamine reactions due to ingestion of tuna fish (*Thunnus argentivittatus*) in patients on anti-tuberculosis therapy". *Toxicon* 19, 184 – 185.
231. Serrar D., Brebant R., Bruneau S., Denoyel G.A. (1995). "The development of a monoclonal antibody - based ELISA for the determination of histamine in food: application to fishery products and comparison with the HPLC assay". *Food Chem* 54, 85 – 91.
232. Shalaby A.R. (1995). "Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods". *Food Chem* 52, 367 – 372.
233. Shalaby A.R. (1996). "Significance of biogenic amines to food safety and human health". *Food Res Int* 29 (7), 675 – 690.
234. Shestowsky W.S., Holmes C.F.B., Hu T., Marr J., Wright J.L.C., Chin J., Sikorski H. (1992). "An anti – okadaic acid anti – idiotype antibody bearing an internal image of ocaidaic acid inhibits prtein phosphatase PP1 and PP2A catalytic activity". *Biochem Biophys Res Commun* 193, 302 – 310.
235. Silla – Santos M.H. (1996). "Biogenic amines: Their importance in foods". *Int J Food Microbiol* 29, 213 – 231.



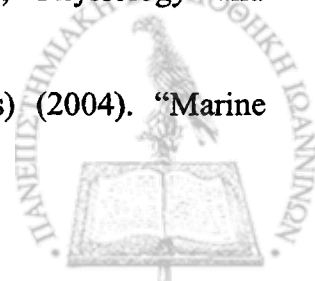
236. Skovgaard N., Ellemann G. (1978). "Levendsmiddelbaren histaminforgiftning". Ugeskr Laeg 140, 313 – 316.
237. Smart D.R. (1992). "Scombroid poisoning. A report of seven cases involving the Western Australian salmon, *Arripid truttaceus*". Med J Aust 157 (11 – 12), 748 – 751.
238. Smith A.M., Hayden M.A., McCay S.G., Zapatka F.A., Hamdy M.K. (1982). "Detection and confirmation of histamine – producing bacteria". Bull Environm Contam Toxicol 29, 618 – 623.
239. Sours H.E., Smith D.G. (1980). "Outbreaks of foodborne disease in the United States". J Infect Dis 142, 122 – 125.
240. Spasov A.A., Chernikov M.V. (2000). "Histamine: Receptors and histaminergic substaces (a review)". Parmac Chem J, 34(8): 395 – 407.
241. Specht D. (1998). "Scombroid fish poisoning". J Emerg Nurs 24 (2), 118 – 119.
242. Stratton J.E., Taylor S.L. (1991). "Scobroid poisoning". In: Ward D, Hackney C (eds): "Microbiology of Marine Food Products". Spectrum, New York, pp. 331 – 351.
243. Stratton J.E., Hutkins R.W., Taylor S.L. (1991). "Biogenic amines in cheese and other fermented foods. A review". J Food Prot 54, 460 – 470.
244. Subburaj M., Karunasagar I., Karunasagar M. (1984). "Incidence of histidine decarboxylating bacteria in fish and market environs". Food Microbiol 1, 263 – 267.
245. Sullivan J. (1988). "Methods of analysis for DSP and PSP toxins in shellfish: A review". Journal of Shellfish Research 7 (4), 587 – 595.
246. Sullivan J. (1993). "Methods of Analysis for Algal Toxins: Dinoflagellate and Diatom Toxins". In: Falconer I. (ed.). "Algal Toxins in Seafood and Drinking Water". Academic Press, New York, pp. 29 – 48.
247. Suzuki U., Yoneyama C., Odake S. (1912). "Composition of "bonito" salt paste." J Coll Agr Tokyo Imp Univ 5, 33 – 41.
248. Suzzi G., Gardini F. (2003). "Biogenic amines in dry fermented sausages: a review". Int J Food Microbiol 88, 41 – 54.
249. Tachibana K., Scheuer P., Tsukitani Y., Kikuchi H., van Engen D., Clardy J., Gopichand Y., Schmitz F. (1981). "Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*". J Am Chem Soc 103 (9), 2469 – 2471.
250. Takagi M., Iida A., Murayama H., Soma S. (1969). "On the formation of histamine during loss of freshness and putrefaction of various marine products". Bull Fac Fish Hokaido Univ 20. 227 – 234.



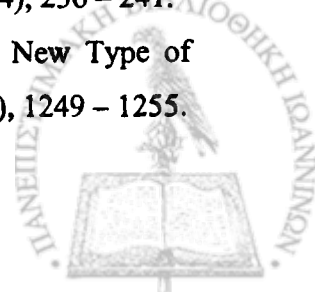
251. Takahashi H., Kimura B., Yoshikawa M., Fuji T. (2003). "Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of Gram negative, histamine – producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish". *Appl Environ Microbiol* 69 (5), 2568 – 2579.
252. Tanase S., Guirard B., Snell E. (1985). "Purification and properties of a pyridoxal – 5' – phosphate – dependent histidine decarboxylase from *Morganella morganii* AM – 15". *J Biol Chem* 260 (11), 6738 – 6746.
253. Taylor S.L. (1983). "Monograph on histamine poisoning". In: "Codex Alimentarius Commission". FAO/WHO, Rome. 19th Session of the Codex Committee on Food Hygiene. Washington, DC, 26 – 30 September 1983.
254. Taylor S.L. (1985). "VPH/FOS/85.1. Histamine Poisoning Associated with Fish, Cheese and Other Foods". World Health Organisation, Geneva.
255. Taylor S.L., Eitenmiller R. (1986). "Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects". *Crit Rev Toxicol* 17 (2), 91 – 128.
256. Taylor S.L., Guthertz L.S., Leatherwood M., Tillman F., Lieber E.R. (1978b). "Histamine production by food-borne bacterial species". *J Food Safety* 1, 173 – 187.
257. Taylor S.L., Guthertz L.S., Leatherwood M., Lieber E.R. (1979). "Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* and an incident of scombroid fish poisoning". *Appl Environ Microbiol* 37, 274 – 278.
258. Taylor S.L., Hui J., Lyons D. (1984). "Toxicology of scombroid poisoning". In: "Seafood Toxins". ACS Symposium Series, No 262, pp. 417 – 430.
259. Taylor S.L., Keefe T.J., Windham E.S., Howell J.F. (1982). "Outbreak of histamine poisoning associated with consumption of swiss cheese". *J Food Prot* 45 (5), 455 – 457.
260. Taylor S.L., Lieber E.R. (1979). "In vivo inhibition of rat intestinal histamine – metabolizing enzymes". *Food Cosmetic Toxicol.* 17, 237 – 240.
261. Taylor S.L., Lieber E.R., Leatherwood M. (1978a). "A simplified method for histamine analysis in foods". *J Food Sci* 43, 247 – 250.
262. Taylor S.L., Speckhard M.W. (1983). "Isolation of histamine – producing bacteria from frozen tuna". *Mar Fish Rev* 45 (4 – 6), 35 – 39.
263. Taylor S.L., Stratton J.E., Nordlee J.A. (1989). "Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): an allergy – like intoxication". *J Toxicol Clin Toxicol* 27 (4 – 5), 225 – 240.
264. Ten Brink B., Damink C., Joosten H.M.L.J., Huis in't Veld J.H.J. (1990). "Occurrence and formation of biologically amines in food". *Int J Food Microbiol* 11, 73 – 84.



265. Ten-Hage L., Delaunay N., Pichon V., Coute A., Puiseux-Dao S., Turquet J. (2000). "Okadaic acid production from the marine benthic dinoflagellate *Prorocentrum arenarium* Faust (Dinophyceae) isolated from Europa Island coral reef ecosystem (SW Indian Ocean)". *Toxicon* 38, 1043-1054.
266. Tham W. (1988). "Histamine formation by enterococci isolated from home – made goat cheese". *Int J Food Microbiol* 7, 103 – 108.
267. Thompson W.H. (1900). "Die physiologische wirkung der protamine und ihrer spaltungsprodukte". *Z Physiol Chem* 29, 1 –19.
268. Todd E.C., Lavallee J., Martin R.S., Greene V.C., Gilgan M.W., Landry G. (1981). "Scombroid poisoning from smoked mackerel – Nova Scotia". *Can Dis Week Rep* 7 (16), 77 – 78.
269. Todd E.C., Brown D.J., Rutherford M., Grolla A., Saarkopel H., Chan A., McGregor G., Reffle J., Ryan S., Jerret N. (1992). "Scombroid posoning – An outbreak in two Ontario communitites". *Can Com Dis Rep* 18 (3), 17 – 19.
270. Trinidad L.M., Narida M.M., Reilly A. (1986). "Production and storage of smoked spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*)". In: McLean J.L., Dizon L.B., Hosillos L.V. (eds.) "The First Asian Fisheries Forum". Asian Fisheries Society, Manilla, pp. 473 – 475.
271. Tubaro A., Florio C., Luxich E., Vertua R., Della loggia R., Yasumoto T. (1996). "Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels". *Toxicon* 34 (9), 965 – 974.
272. Tucker W. B. (1997). Overview of current Seafood Nutritional Issues: Formation of Potentially Toxic Products. In: Sahidi F., Jones Y. and Kitts D.D. (eds) "Seafood safety, processing and biotechnology". Technomic Publications Company Inc., Lancaster, Pennsylvania USA, pp. 5-16.
273. Vale P., Sampayo M.A.M. (2002). "First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro Lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton". *Toxicon*, 40, 511 – 517.
274. Van Dolah F. (2000). "Diversity of marine and freshwater algal toxins". In: Botana L.M. (ed.). "Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection". Marcel Dekker, New York, pp. 19 – 43.
275. Van Egmond H.P., Van Apeldoorn M.E., Speijers G.J.A. (eds) (2004). "Marine Biotoxins". *FAO Food and Nutrition Paper* 80, Rome.



276. Van Gelderen C.E.M., Savelkoul T.J.F., Van Ginkel L.A., Van Dokkum W. (1992). "The effects of histamine administered in fish samples to healthy volunteers". *Clin Toxicol* 30, 585 – 596.
277. Van Spreekens K. (1987). "Histamine production by the psychrophilic flora". In: Kramer D.E., Liston J. (eds.). "Seafood Quality Determination". Elsevier, Amsterdam, pp. 309 – 318.
278. Varvarigos P. (2001). "Gram positive cocco-bacteria (*Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*) causing systemic disease in intensively farmed fish. Brief review". http://www.vetcare.gr/Gram_positive_cocci.htm#epizootiology.
279. Veciana-Nogués M.T., Hernandez-Jover T., Mariné-Font A., Vidal-Carou M.C. (1995). "Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish and fish products". *J AOAC Int* 78, 1045 – 1050.
280. Vieytes M., Louzao M.C., Alfonso A., Calbado A.G., Botana L.M. (2000). "Mechanism of action and Toxicology". In: Botana L.M. (ed). "Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection". Marcel Dekker, New York, pp. 239 – 256.
281. Vilhelmsson O., Hafsteinsson H., Kristjansson J.K. (1997). "Extremely halotolerant bacteria characteristic of fully cured and dried cod". *Int J Food Microbiol* 36, 163 – 170.
282. Viviani R., Boni L., Cattani O., Milandri A., Poletti R., Pompei R., Sansoni G. (1995). "ASP, DSP, NSP and PSP monitoring in "mucilaginous aggregates" and in mussels in a coastal area of the Northern Adriatic Sea facing Emilia – Romagna in 1988, 1989 and 1991". *The Science of Total Environment*, 165, 203 – 211.
283. Voigt M.N., Eitenmiller R.R., Koeliler P.E., Handy M.K. (1974). "Tyramine, histamine, and tryptamine content of cheese". *J Milk Food Technol* 37, 377 – 388.
284. Wei C.I., Chen C. –M., Koburger J.A., Otwell W.S., Marshall M.R. (1990). "Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna". *J Food Sci* 55 (1), 59 – 63.
285. WHO (World Health Organization). (1997). Food safety and foodborne diseases. *World Health Statistics Quarterly*, Volume 50.
286. Wille J.J., Kydonieus A., Kalish R.S. (1999). "Several different ion channel modulators abrogate contact hypersensitivity in mice". *Skin Pharmacol Appl*
287. Wu M. –L., Yang C. –C., Yang G. –Y., Ger J., Deng J. –F. (1997). "Scombroid fish poisoning: an overlooked marine food poisoning". *Vet Hum Toxicol* 39 (4), 236 – 241.
288. Yasumoto T., Yasukatsu O., Yamaguchi M. (1978). "Occurrence of a New Type of Shellfish Poisoning in the Tohoku District". *Bull Jap Soc Sci Fish* 44 (11), 1249 – 1255.



289. Yasumoto T., Murata M., Oshims Y., Matsumoto G.K., Clardy J. (1984). "Diarrhetic shellfish poisoning". In: Ragelis E.P. (ed.). "Seafood toxins". AOAC International, Washington DC, pp. 214 – 217.
290. Yasumoto T. (2000). "Historic considerations regarding seafood safety". In: Botana L.M. (ed.). "Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection". Marcel Dekker, New York, pp. 1 – 17.
291. Yen G., Hsieh C. (1991). "Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC". J Food Sci 56 (1), 158 – 160.
292. Yohannes K., Dalton C., Halliday L., Unicomb L., Kir M. (2002). "An outbreak of gastrointestinal illness associated with the consumption of escolar fish". Commun Dis Intell 2002;26:441 – 445.
293. Yoshinaga D.H., Frank H.A. (1982). "Histamine – producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*)". Appl Environ Microbiol 44, 447 – 452.
294. Zee J.A., Simard R.E., Vaillancourt R., Boudreau A. (1981). "Effect of *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces uvarum* and grist composition on amine formation in beers". Can Institute Food Sci Technol 14 (4), 321 – 325.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

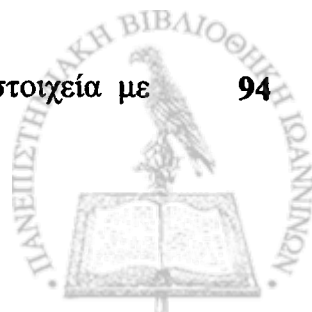
1. Μαρσέλος Μ., Μάλαμας Μ. (2004). «Ιατρική Φαρμακολογία Ι». Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
2. Παπαδοπούλου Χ. (2001). «Μικροβιολογία Τροφίμων και στοιχεία Υγιεινής Τροφίμων». Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
3. Παπαναστασίου Δ. (1990). «Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος Αλιευμάτων». Εκδόσεις Ίων, Αθήνα 1990.
4. Τσιγουρή Α., Τυρπένου Α., Γούτα-Παπασταύρου Ε. (1990). «Προσδιορισμός της ισταμίνης στα ιχθυηρά». Πρακτικά 5^ο Πανελληνίου Κτηνιατρικού Συνεδρίου, Κ – 20.



ΥΠΟΜΝΗΜΑ

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1. Οι κυριότεροι επιμολυντές των τροφίμων ζωικής προέλευσης	4
Πίνακας 2. Τροφιμογενείς επιδημίες και περιστατικά εξαιτίας κατανάλωσης θαλασσινών τροφίμων σε σχέση με το σύνολο των τροφίμων ζωικής προέλευσης και των τροφίμων πάσης προέλευσης	6
Πίνακας 3. Αίτια δηλητηριάσεων από τοξικά θαλασσινά τρόφιμα	7
Πίνακας 4. Πρόδρομα αμινοξέα και παράγωγες βιογενείς αμίνες	19
Πίνακας 5. Βιογενείς αμίνες και βακτήρια που απομονώθηκαν σε διάφορα τρόφιμα	20
Πίνακας 6. Εντοπίσεις και δράσεις των H ₁ και H ₂ υποδοχέων	23
Πίνακας 7. Εντοπίσεις και δράσεις των H ₃ υποδοχέων	23
Πίνακας 8. Ψάρια που έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση δηλητηρίασης από ισταμίνη	31
Πίνακας 9. Ισταμινοπαραγωγά βακτήρια που απομονώθηκαν από ψάρια θαλάσσης	39
Πίνακας 10. Μέθοδοι προσδιορισμού ισταμίνης	47
Πίνακας 11. Εμπορικά ανοσοενζυμικά σκευάσματα ανίχνευσης ισταμίνης σε αλιεύματα	52
Πίνακας 12. Σύνθεση των κυριότερων διαφοροποιητικών υποστρωμάτων για ανίχνευση ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων σε αλιεύματα	56
Πίνακας 13. Σύνθεση των κυριότερων διαφοροποιητικών υποστρωμάτων για ανίχνευση Οξυγαλακτικών ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων	57
Πίνακας 14. Πρωτόκολλο χειρισμών τόννων	81
Πίνακας 15. Παράμετροι μικροβιολογικής εξέτασης θερμικά κακομεταχειρισμένων τόννων	84
Πίνακας 16. Σύνθεση υποστρωμάτων αποκαρβοξυλίωσης	92
Πίνακας 17. Σύνθεση υγρών υποστρωμάτων πτωχών σε θρεπτικά στοιχεία με pH=6,00	93
Πίνακας 18. Σύνθεση υγρών υποστρωμάτων πτωχών σε θρεπτικά στοιχεία με pH=6,50	94



Πίνακας 19. Σύνθεση υποστρωμάτων μαρτύρων	94
Πίνακας 20. Μέση τιμή συγκέντρωσης ισταμίνης και δεκαδικών λογαρίθμων καταμετρήσεων μικροβίων σε νωπά φιλέτα τόννου που συντηρήθηκαν στους 5-7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 25°C	103
Πίνακας 21. Μέση τιμή συγκέντρωσης ισταμίνης και δεκαδικών λογαρίθμων καταμετρήσεων μικροβίων σε κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 3-4°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 20°C	104
Πίνακας 22. Μέση τιμή συγκέντρωσης ισταμίνης και δεκαδικών λογαρίθμων καταμετρήσεων μικροβίων σε νωπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 0-2°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C	105
Πίνακας 23. Μέση τιμή συγκέντρωσης ισταμίνης και δεκαδικών λογαρίθμων κατάμετρήσεων μικροβίων σε νωπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους που συντηρήθηκαν στους 6-7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C	106
Πίνακας 24. Κατάλογος απομονωθέντων στελεχών	111
Πίνακας 25. Δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης αμινοξέων με Møeller decarboxylase broth (MD broth)	114
Πίνακας 26. Συγκέντρωση ισταμίνης σε υπερκείμενα καλλιέργειών σε Møeller decarboxylase broth	117
Πίνακας 27. Ταχείς και βραδείς παραγωγείς ισταμίνης	119
Πίνακας 28. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των καλλιέργειών βακτηριακών στελεχών στα εκλεκτικά υποστρώματα Niven, Modified Niven και Møeller decarboxylase, που δείχνουν την ικανότητα απομόνωσης των τριών υποστρωμάτων	120
Πίνακας 29. Αναλυτικά αποτελέσματα της ικανότητας απομόνωσης ισταμινοπαραγωγών βακτηρίων των Niven, m – Niven και Møeller decarboxylase στερεών και υγρών εκλεκτικών υποστρωμάτων	121
Πίνακας 30. Γραφική παράσταση και μέσες τιμές pH υποστρωμάτων 1-4 και μαρτύρων μετά από 72 h επώασης (pH=6,00)	126
Πίνακας 31. Γραφική παράσταση και μέσες τιμές pH υποστρωμάτων 5-8 και μαρτύρων μετά από 72 h επώασης (pH=6,00, με πυριδοξάλη)	126



Πίνακας 32. Γραφική παράσταση και μέσες τιμές pH υποστρωμάτων 9–13 και μαρτύρων μετά από 72 h επώασης(pH=6,50)	127
Πίνακας 33. Γραφική παράσταση και μέσες τιμές pH υποστρωμάτων 15–18 και μαρτύρων μετά από 72 h επώασης(pH=6,50 με πυριδοξάλη)	127
Πίνακας 34. Ημερομηνία δειγματοληψίας και προέλευση δειγμάτων. Συμπτώματα και χρόνος θανάτου ποντικιών	129

ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα 1. Προέλευση των αιτίων των τροφιμογενών νόσων, που οφείλονται σε θαλασσινά τρόφιμα (Πηγή: Tucker, 1997)	7
---	---

ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

Γράφημα 1. Επιδημικές εξάρσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη στην Αγγλία μεταξύ 1976 και 1990	11
Γράφημα 2. Επιδημικές εξάρσεις στις Η.Π.Α. μεταξύ 1968 και 1983	13
Γράφημα 3. Επιδημικές εξάρσεις στις Η.Π.Α. μεταξύ 1987 και 1997	14
Γράφημα 4. Επιδημικές εξάρσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη στην Ιαπωνία μεταξύ 1970 και 1980	16
Γράφημα 5. Συγκέντρωση ισταμίνης σε νωπά φιλέτα τόννου που συντηρήθηκαν στους 0 – 2°C και 5 – 7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 25°C για 1 και 3 h	107
Γράφημα 6. Συγκέντρωση ισταμίνης σε νωπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 0 – 2°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά	107
Γράφημα 7. Συγκέντρωση ισταμίνης σε κατεψυγμένους τόννους που συντηρήθηκαν στους 3 – 4°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 20°C για 2 h καθημερινά	108
Γράφημα 8. Συγκέντρωση ισταμίνης σε νωπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 6 – 7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά	108



Γράφημα 9: Τυχαία κατανομή λογαρίθμων καταμετρήσεων ολικής μεσόφιλης χλωρίδας έναντι συγκεντρώσεων ισταμίνης σε νωπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 6–7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά	109
Γράφημα 10: Τυχαία κατανομή λογαρίθμων καταμετρήσεων ολικών εντεροβακτηριακών έναντι συγκεντρώσεων ισταμίνης σε νωπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 6 –7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά	109
Γράφημα 11: Τυχαία κατανομή λογαρίθμων καταμετρήσεων κολοβακτηριοειδών έναντι συγκεντρώσεων ισταμίνης σε νωπούς και κατεψυγμένους ολόκληρους τόννους που συντηρήθηκαν στους 6 – 7°C και υπέστησαν θερμική κακομεταχείριση στους 30°C για 2 h καθημερινά	110
Γράφημα 12. Σύγκριση ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA και φθορισμομετρικής μεθόδου (εύρος τιμών 0 – 100 ppm)	112
Γράφημα 13. Σύγκριση ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA και φθορισμομετρικής μεθόδου (τιμές > 100 ppm)	113

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1. Γραφική και στερεοχημική απεικόνιση του μορίου της ισταμίνης	18
Εικόνα 2. Σύνθεση της ισταμίνης	22
Εικόνα 3. Χημική δομή του οκαδαϊκού οξέος και των κυριότερων δινοφυστοξινών	59
Εικόνα 4. Χημική δομή των πεκτενοτοξινών	60
Εικόνα 5. Χημική δομή των γεσσοτοξινών	61
Εικόνα 6. Τοξικά δινομαστιγωτά <i>Dinophysis</i> spp.	62
Εικόνα 7. Τοξικά δινομαστιγωτά <i>Prorocentrum</i> spp.	63
Εικόνα 8. Στερεά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν	93
Εικόνα 9. Σημεία αλίευσης των εξετασθέντων δειγμάτων μυδιών	96
Εικόνα 10. Καλλιέργειες του στελέχους <i>M. morganii</i>	138

