

PRESENZA D'ISTAMINA NEI PRODOTTI ITTICI IN COMMERCIO

OCCURANCE OF HISTAMINE IN FISH PRODUCTS ON MARKET

Mancusi R., Bini R.M., Cecchini M., Delle Donne G., Rosmini R., Trevisani M.
Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - Università di Bologna.

SUMMARY

Histamine fish poisoning is quite common and occur in consequence of microbial decarboxylase whose activity begin early in the post-mortem but are triggered in consequence of abuse in the shelf life of fish products. In this study forty-eight samples of tuna, mackerel, anchovies, sardines, fresh or processed were sampled from fish shops and supermarkets in the City of Bologna in the period from January to July 2010. Concentration of histamine was assessed using ELISA quantitative test and presence of psicrotrophic histamine forming bacteria was searched using a modified Niven agar medium which allow detection of suspect colonies that were confirmed by PCR for detecting the presence of the histidine decarboxylase genes in their DNA. The positive colonies were then identified on the basis of their morphology, Gram reaction and biochemical characteristics with API20E. The differential capability of the Niven agar was found to be low and approximately one fifth of the suspect colonies were confirmed by the PCR test, which however included both strong and weak histamine producing strains. The presence of *Morganella morganii* was associated with concentration of histamine $460 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ above the allowed limit in a sample of tuna sampled from a fish shop. The same bacterium was found in samples of Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). High histamine concentration (between 258 and $> 300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) were observed in salted European pilchard and European anchovy ($228 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) sold loose in supermarkets. Because temperature abuse could occur when Tuna (fresh/defrozen) are hold on chopping board to sell fresh cuts and during shelf life of salted pilchard and pickled anchovies held in opened cans in chilled display cabinets for extended period, which might results in very high histamine concentration, controls on time and temperature at the retail, in addition to those done during the harvest and processing are needed. The studies aiming at quantitatively assess the prevalence and number of histamine producing bacteria in fish products that were not involved in histamine poisoning cases and/or do not show high level of histamine are rather complex , requiring many tests for confirming the histamine forming ability of the suspect isolated strains and further studies are needed to develop techniques for enumerating the histamine producing bacteria.

KEYWORDS

histamine, histidine decarboxylase, fish poisoning, shelf life, *Morganella morganii*.

INTRODUZIONE

L'intossicazione da istamina è una malattia di origine alimentare che si manifesta con eruzioni cutanee, arrossamenti, sudorazione, sensazione di bruciore in bocca, talvolta con nausea, vomito, diarrea, bruciore di stomaco, mal di testa, formicolio, gonfiore, giramenti di testa e più raramente con sintomi nervosi e shock anafilattici.

Le manifestazioni sono correlate alla elevata concentrazione d'istamina che si accumula quando le carni sono contaminate da batteri produttori di istidino-decarbossilasi, raggiungendo concentrazioni tossiche rilevanti in alcune specie ittiche nelle cui carni la concentrazione d'istidina libera è maggiore (1,2,3). La quantità tossica dipende dalla sensibilità individuale dei consumatori ed è favorita dalla presenza di altre amine (putrescina, cadaverina, spermina e

spermidina) prodotte in conseguenza di fenomeni alterativi. La sensibilità dei consumatori è maggiore e la sindrome si manifesta a concentrazioni più basse d'istamina quando l'attività delle amino-ossidasi epatica ed intestinale è inibita in conseguenza dell'assunzione di taluni farmaci (es. antidepressivi) o c'è un sovraccarico di questi meccanismi di detossificazione in conseguenza di eccessiva assunzione di bevande alcoliche (1,2,4). I principali batteri capaci di decarbossilare l'istidina in prodotti ittici sono Gram negativi delle famiglie *Enterobacteriaceae* e i batteri del genere *Photobacterium* (Famiglia *Vibrionaceae*) (2). Nei pesci e in crostacei pescati in acque medio-profonde e superficiali sono predominanti le *Enterobacteriaceae* psicrotrofe, capaci di sviluppare a temperature di refrigerazione, mentre in pesci di specie bentoniche sono particolarmente importanti i batteri del genere *Photobacterium*. L'istamina si accumula nelle carni un quantità tossiche prima che si manifestino alterazioni e l'accumulo è favorito dalle temperature più alte (2). La cottura del pesce non la inattiva e neppure la sterilizzazione utilizzata per la produzione di conserve ittiche. Se i pesci sono sottoposti a maturazione enzimatica in salamoia lo sviluppo di alcune specie produttrici istidino-decarbossilasi non è inibito e si può osservare un maggiore accumulo d'istamina, che è anche favorito dall'azione delle catepsine muscolari del pesce che portano alla formazione di aminoacidi liberi, tra cui l'istidina, che viene degradata dalle decarbossilasi batteriche (5). La quantità massima ammessa nei prodotti ittici, i metodi di analisi ed i piani di campionamento sono definiti dal regolamento (CE) 1441/2007(6). I limiti, m (i valori inferiori sono giudicati soddisfacenti) ed M (i valori superiori sono giudicati inaccettabili) sono applicabili ai prodotti ittici immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità, perciò l'attuazione della norma dovrebbe prevedere una valutazione del rischio relativo all'accumulo d'istamina durante le fasi della distribuzione e vendita, quando il prodotto non è sotto il diretto controllo del produttore. Come previsto dal legislatore, il rischio riguarda in modo particolare i pesci delle famiglie *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatidae*, *Scombrosidae* e nel caso di prodotti in salamoia, che hanno subito un 'trattamento di maturazione enzimatica' i limiti ammissibili d'istamina sono raddoppiati (6). Il presente lavoro ha avuto lo scopo d'indagare sui livelli di contaminazione di pesci e semiconserve ittiche presenti sul mercato e in una seconda fase caratterizzare, in alcuni campioni, la flora microbica responsabile della produzione d'istamina.

MATERIALI E METODI

Nel periodo gennaio-luglio 2010 sono stati acquistati sul mercato pesci e prodotti ittici rappresentativi di tipologie considerate 'a rischio' e in modo particolare prodotti venduti a trancio e conserve sotto sale vendute sfuse perché maggiormente esposte ad abusi di temperatura. Complessivamente sono stati presi 46 campioni da 6 supermercati, 5 pescherie, 2 spacci alimentari e 1 mensa. Questi sono stati trasportati in laboratorio in borse frigorifero e processati nel giro di 6 ore al massimo dall'acquisto. Tutti e 46 i campioni sono stati sottoposti al saggio immunoenzimatico ELISA e 17 di questi, prelevati nel periodo estivo, sono stati sottoposti ad analisi microbiologiche per l'individuazione di batteri istamino-produttori (Tabella 1). Le analisi sono state fatte utilizzando un saggio enzimatico quantitativo di tipo competitivo (Histamine Elisa Kit, Tecna®, Trieste) seguendo le istruzioni del produttore. I campioni in tranci o filetti ed i pesci freschi di piccole dimensioni, decapitati ed eviscerati, sono stati analizzati interamente, di quelli più dimensioni più grandi (sgombri, suri, aringhe affumicate) è stata presa per le analisi la parte mediale prossima alla cavità addominale. I campioni prelevati in modo asettico sono stati finemente sminuzzati ed omogeneizzati. Due grammi di omogenato sono stati diluiti con 18 ml di acido tricloroacetico (TCA) 10% e l'estrazione dell'istamina in soluzione TCA è stata fatta agitando la sospensione su vortex. Gli estratti filtrati sono stati quindi congelati in attesa di completare le analisi. Per eseguire il test immunoenzimatico gli estratti devono essere diluiti con HCl 0,1 M in funzione della concentrazione attesa d'istamina, stimando una concentrazione compresa tra 10 e 300 mg·kg⁻¹ (ppm) è stata utilizzata una diluizione 1:250. Per le analisi microbiologiche sono stati prelevati in modo asettico dalla superficie dei tranci di tonno e dai pesci freschi (sgombro e suri) 20 cm² di tessuto muscolare. I campioni di sgombro e suro fresco sono stati perciò prima spellati. Da filetti di pesce e pesci di piccole dimensioni (alici e sardine) parti superficiali dei campioni di sgombro, suro, aringhe e tranci di tonno sono stati prelevati 10 g di prodotto. Dopo aver pesato ed omogeneizzato i campioni in PBS (diluizione 1:10) sono state fatte diluizioni seriali, per poi seminarne 1 ml, per inclusione, in terreno di Niven modificato (7,8) ed incubato a 32°C. Laddove presenti, fino ad un massimo di 5 colonie isolate tipiche per ciascun campione, di color violaceo sono state prelevate e strisciate su TSA. Il DNA delle colonie in purezza è stato estratto mediante ebollizione (per 5 minuti) in 1 ml di acqua sterile priva di DNasi. La per la ricerca del gene HDC (istidina-decarbossilasi) è

stata fatta impiegando 20 microlitri di miscela di reazione SSOFast™ EvaGreen^R Supermix (BioRad, Hercules CA, US) contenente 10 ng di template DNA ed i primers 106 (5'-AAATCNTTYGAYTTYGARAARGARG) e 107 (5'-ATNGGNGANCCDATCATYTTTRTGNC) che amplificano un frammento del gene *hdc* con dimensione di 534-bp comune a batteri Gram negativi, compresi i generi *Raoultella*, *Morganella*, *Pseudomonas* e *Photobacterium* (9). I cicli di amplificazione sono stati fatti a : 95°C per 30 sec, 52°C per 30 sec e 72°C per 2 min per 30 cicli, preceduti da uno step iniziale a 95°C per 10

min e seguiti da uno step finale di estensione a 72°C per 10 min. I prodotti di amplificazione sono stati esaminati con elettroforesi in gel di agarosio 1,5% dopo colorazione con etidio bromuro. Le colonie positive allo screening PCR sono poi sottoposte ad API 20E (Biomerieux®) per il riconoscimento di specie.

RISULTATI

I risultati riguardanti il test ELISA, la specie e la provenienza del prodotto sono schematizzati in Tabella 1.

Tabella 1. Tipologia e luogo di acquisto dei prodotti ittici campionati e risultati del test immunoenzimatico per la quantificazione dell'istamina (ELISA)

SPECIE	TIPO PRODOTTO	LUOGO ACQUISTO	N	M	ISTAMINA (mg·kg ⁻¹)
Tonno rosso <i>Thunnus thynnus</i>	trancio congelato	supermercato	1		33
	sashimi decongelato	supermercato	1		<10
Tonno a pinne gialle <i>Thunnus albacares</i>	trancio fresco	supermercati	3		da <10 a 46
	trancio fresco	pescherie	4	2	da 12 a 460
	trancio congelato	supermercato	1		<10
	sott'olio sfuso	supermercati	3	2	da <10 a 32
	insalata di tonno	mensa	2	1	da <10 a 23
Tonno alletterato <i>Euthynnus alletteratus</i>	trancio fresco	supermercato	1		19
Sgombro <i>Scomber scombrus</i>	fresco	supermercato	1		<10
	fresco	pescherie	4	3	da <10 a 12
	filetti freschi	supermercato	1		<10
	filetti sottolio sfusi	supermercato	1		28
	filetti grigliati sfusi	supermercato	1		11
	filetti marinati sfusi	supermercati	2	1	<10
Acciuga/alice <i>Engraulis encrasicolus</i>	sottosale sfuse	supermercati	2		da 11 a 30
	sottosale sfuse	alimentari	1		<10
	salsa verde sfuse	supermercato	1	1	26
	salate piccanti sfuse	supermercato	1		<10
	salate piccanti sfuse	supermercato	1		156
	filetti marinati sfusi	supermercati	2	1	da 21 a 228
	fresche	supermercato	1		29
	fresche	pescheria	1	1	15
Aringhe <i>Clupea harengus</i>	filetti freschi	supermercati	2		<10
	filetti marinati sfusi	supermercati	2	2	da 16 a 20
	intera affumicata	supermercato	1		58
Sardina <i>Sardina pilchardus</i>	sottosale sfuse	supermercato	1		>300
	sottosale sfuse	alimentari	1		258
	fresche	pescheria	1	1	<10
	fresche	supermercato	1	1	11
Suro <i>Trachurus trachurus</i>	fresco	pescheria	1	1	13
	fresco	supermercato	1		<10
Totale			46	17	

Legenda: N= numero campioni; M= esaminati microbiologicamente

In un solo campione, tonno fresco venduto in tranci presso un mercato rionale, è stato raggiunto un valore pari 460 mg·kg⁻¹ superiore al limite di legge 'M', in un altro campione di tonno fresco è stato rilevato un valore pari a 117 mg·kg⁻¹. Valori rilevanti, compresi tra 200 e 400 mg·kg⁻¹ sono stati osservati in sardine sotto sale vendute sfuse. In un caso il valore non è stato definito (> 300 mg·kg⁻¹) in quanto non è stato

possibile ripetere l'analisi con una maggiore diluizione. Anche nei filetti di acciughe marinate, per le quali, in vero, il processo di maturazione enzimatica è più limitato, sono stati rilevati valori pari a 228 mg·kg⁻¹. Di questi campioni con valori d'istamina elevati, solo il primo è stato preso nel periodo estivo e pertanto sottoposto agli esami microbiologici. In questo caso è stata individuata la presenza di colonie istidino-

decarbossilasi positive (test PCR) ascrivibili alla specie *Morganella morganii*.

Gli esami microbiologici mostrano che da 9 campioni dei 17 analizzati (Tabella 1) state colonie sospette sul terreno di Niven ma solo in tre è stata confermata la presenza di colonie positive al test PCR per il gene HDC (responsabile della produzione di istidino-decarbossilasi). In questi tre campioni è stata evidenziata la presenza di *Morganella morganii* in due casi e di *Pseudomonas fluorescens* in un caso. Due colonie positive al test PCR isolate da un campione di tonno non sono state identificabili con il kit API20E.

Tabella 2. Risultati esami microbiologici colturali (positività terreno Niven), molecolari (presenza HDC) e identificazione biochimica di specie

Prodotto	Campioni con colonie sospette	Campioni positivi test PCR	Specie API20E
Trancio tonno fresco (P)	2	1	<i>Morganella morganii</i> (8 colonie) non identificate (2 colonie)
Sardine fresche (P)	1	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Suro fresco (P)	1	1	<i>Morganella morganii</i>
Sgombro fresco (P)	3	0	n.e.
Insalata di tonno (M)	1	0	n.e.
Acciughe fresche (P)	1	0	n.e.

Leggenda: NE = non eseguita; P=acquistato in pescheria; M= prelevato in mensa.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati indicano che un solo prodotto su 46 presentava valori di istamina superiori al limite di accettabilità (M). Il campione era un trancio di tonno fresco (*Thunnus albacares*) venduto come taglio fresco presso una pescheria. Questo tipo di vendita è fatto mantenendo a lungo il pesce su un tagliere e non in frigo, con periodi di abuso termico e soprattutto se il prodotto è tenuto in vendita per diversi giorni l'accumulo d'istamina può aumentare, particolarmente in presenza di specie HDC quali *Morganella morganii*. Altri tre campioni, due di sardine sottosale ed uno di alici marinate, venduti sfusi al banco (pescheria o supermercato) presentavano valori compresi tra 200 mg·kg⁻¹ e 400 mg·kg⁻¹.

Trattandosi di prodotti sottoposti ad un periodo di maturazione enzimatica nel corso del processo produttivo, tali valori rientrano nell'intervallo 'm' ed 'M' definito dal Regolamento 1441/2007 (6). In un caso non siamo sicuri che il valore fosse effettivamente inferiore ad 'M' poiché il valore è stato superiore al limite di determinazione (300 mg·kg⁻¹) rilevabile impiegando la diluizione 1:250. Si tratta di livelli d'istamina elevati che, seppure in un numero limitato di campioni, indicano a nostro giudizio che è alta la frequenza con la quale sardine e alici sotto sale o marinate, vendute sfuse presentavano valori che rientrano in una classe marginale di accettabilità. Va specificato che non è possibile attribuire un giudizio di merito sul lotto (le scatole erano già aperte ed il campionamento non prevedeva il prelievo di 9 unità campionarie) e quindi sulle cause, ma non possiamo non considerare l'importanza del valutazione del termine di commercializzazione e del controllo della temperatura nella fase di esposizione per la vendita di semiconserve per la vendita frazionata. Per quanto riguarda l'isolamento di colonie di ceppi istamino-produttori abbiamo rilevato che il terreno colturale di Niven ha una bassa specificità e solo in 3 dei campioni con colonie sospette è stato possibile individuare la presenza del gene HDC e la presenza di numerose colonie sospette non è necessariamente indicativa della presenza di specie produttrici d'istamina, come peraltro è stato riferito da altri autori (10,11), che indicano un tasso di falsi positivi molto alto oltre il 50%, come anche noi abbiamo riscontrato. La bassa capacità discriminante è dovuta al fatto che il riconoscimento delle colonie è connesso alla alcalinizzazione del terreno causata dalla decarbossilazione dell'istidina, che i batteri HDC utilizzano come fonte di energia in un terreno privo di carboidrati, ma anche altre specie possono causare, nell'arco di 48 ore, il viraggio di colore del terreno conseguente alla produzione di composti basici quali l'ammoniaca. Seppur con numeri limitati questa ricerca ha permesso l'isolamento in prodotti in commercio di specie batteriche, quali *Morganella morganii*, considerate tra i principali produttori di istamina nel pesce (2). Mentre in un caso (campione di tonno in trancio) la presenza di *Morganella* era concomitante con la presenza di valori molto alti d'istamina (460 mg·kg⁻¹) in un altro (suro) il campione aveva livelli di istamina molto bassi. La gestione della catena del freddo, è più complessa per pesci di grandi dimensioni venduti con taglio fresco. Una valutazione quantitativa dei batteri produttori d'istamina non può essere fatta mediante il conteggio delle colonie sospette su terreno di Niven ed anche il ricorso alla

PCR per il saggio delle colonie sospette non discrimina immediatamente i ceppi forti produttori d'istamina per cui sono in atto studi finalizzati a individuare test e marker più specifici. Vanno discriminate ad esempio specie HDC positive, quali *Pseudomonas fluorescens*, attraverso l'impiego di terreni selettivi e test biochimici. Non va trascurato a tal riguardo che batteri Gram- non identificabili con il kit API20E, quali *Photobacterium phosphoreum*, sono stati implicati in focolai d'intossicazione da istamina e dovrebbero essere ricercati, particolarmente nelle specie ittiche bentoniche con le quali sarebbero maggiormente associate.

BIBLIOGRAFIA

1. Hungerford J. M. , "Scombroid poisoning: a review", *Toxicon*, vol. 56, agosto 2010, pp. 231-243.
2. Lehane L. , Olley J. , "Histamine fish poisoning revisited", *Int. J. Food Microbiol.*, n. 58, 2000, pp. 1-37.
3. Ijomah P. , Clifford M. N. , Walker R. , Wright J. , Hardy R. , Murray C. K. , "Further volunteer studies on scombrototoxicosis" In: *Burt, J.R., Hardy, R., Whittle, K.J. (Eds.), Pelagic Fish: The Resource and its Exploitation. Fishing News Books, Oxford, 1992, pp. 194-199.*
4. Taylor S. L. , "Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects", *Crit. Rev. Toxicol.*, n. 17, 1986, pp. 91-128.
5. Giuffrida A. , Panebianco A. , "Prodotti ittici e istamina", *Igiene e tecnologie degli alimenti di origine animale*, a cura di Colavita G. , Le Point Vétérinaire Italie, Milano, cap. 8, par.8.2.4, 2008, pp. 280-281
6. Regolamento CE 1441/2007 del 5 Dicembre 2007 "che modifica il Regolamento CE 2073/2005 sui criteri microbiologici applicati ai prodotti alimentari", *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* numero 322 del 07/12/2007
7. Mavromatis P. , Quantick P. C. , "Modification of Niven's medium for the enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use", *J. Food Prot.*, n. 65, 2002, pp. 546-551.
8. Niven C.F. Jr, Jeffrey M.B., Corlett D.A. Jr, "Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria", *Appl Environ Microbiol.*, n. 41, gennaio 1981, pp. 321-322.
9. De las Rivas B. , Marcobal A. , Muñoz R. 2005. "Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines", *FEMS Microbiol. Lett.*, n.244, 2005, pp. 367-372.
10. Lopez-Sabater E. I. , Rodriguez-Jerez J. J. , Hernandez-Herrero M. , Mora-Ventura M. A. T., "Evaluation of histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) by an enzymatic method", *Lett. Appl. Microbiol.* n. 19, 1994, pp. 70-75.
11. Tsai Y. , Kung H. , Lee T. , Lin G. , Hwank D. , "Histamine-Related Hygienic Qualities and Bacteria Found in Popular Commercial Scombroid Fish Fillets in Taiwan", Department of Food Science and Technology, Tajen Institute of Technology, Pingtung, Taiwan, Republic of China; and 2Department of Food Science, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan, Republic of China, February 2003.