



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

Tesi di Laurea
L₁ISTAMINOSI DA PRODOTTI DELLA PESCA:
NUOVI SISTEMI DIAGNOSTICI PER IL VETERINARIO.
PRIMI RISULTATI SPERIMENTALI

Relatore:
Prof. VALERIO GIACCONE
Correlatore:
Dott. RICCARDO MIOTTI SCAPIN

Laureanda:
MARIA DAINESE
Matricola n. 598334

ANNO ACCADEMICO 2014 - 2015

Riassunto

L'istaminosi è un'intossicazione alimentare acuta causata prevalentemente dal consumo di prodotti ittici contenenti alti livelli di istamina e probabilmente altre amine biogene. L'istamina si forma grazie all'azione dell'enzima istidina-decarbossilasi presente in alcuni microrganismi. Questo enzima trasforma in istamina l'istidina contenuta nella sua forma libera in varie matrici alimentari. I batteri istaminogeni in basse percentuali possono già essere presenti nei visceri dei pesci; la loro percentuale nei prodotti ittici aumenta notevolmente a causa di contaminazioni che possono avvenire in mare o successivamente alla pesca. Nell'ambito della profilassi e dell'igiene alimentare è quindi importante poterli isolare ed identificare al fine di prevenire, per quanto possibile, l'insorgenza di episodi di istaminosi.

Lo scopo di questa ricerca è stato quindi mettere a confronto l'efficacia di due terreni differenziali nell'isolamento delle flore istamino-produttrici presenti nei prodotti della pesca. Il terreno di Niven, classicamente utilizzato per questo scopo, è stato comparato con un altro substrato di coltura, il *Seawater Agar Medium*, che utilizza come il primo un viraggio cromatico per evidenziare la formazione di istamina. Nell'ambito di questo lavoro sono state apportate inoltre delle modifiche alla composizione di quest'ultimo allo scopo di migliorarne l'efficacia. I dati preliminari sono suggestivi di un considerevole numero di vantaggi nell'utilizzo del *Seawater Agar Medium* modificato rispetto al terreno di Niven.

Abstract

Histamine Fish Poisoning (HFP) is an acute foodborne intoxication caused by the ingestion of fishery products which contain high levels of histamine and probably other biogenic amines. Histamine is produced by bacterial histidine-decarboxylases. The free histidine contained in various food matrices is turned into histamine by this type of enzymes. Histidine-decarboxylating bacteria (HDB) are found in small percentage within fish bowels. Their percentage in fishery products greatly increases due to a sea contamination or after fish-catching.

With regard to prophylaxis and food hygiene, the detection and identification of HDB are essential to prevent Histamine Fish Poisonings occurrence. The purpose of this research is to compare two differential growth media in detecting fishery products HDB. Niven's medium, which is notably standardly employed, was compared with Seawater Agar Medium. The latter, as the former, highlights the colour changing due to histamine formation by the use of pH indicators. In this research, moreover, some changes has been made in the Seawater Agar Medium's composition with the purpose to increase its effectiveness. Preliminary data are suggestive of a great number of advantages in using modified Seawater Agar Medium compared to Niven's medium.

Indice generale

Capitolo 1: Introduzione	1
Capitolo 2: Rassegna bibliografica	3
2.1 LE MALATTIE ALIMENTARI	3
2.2 L'ISTAMINOSI	8
2.3 L'ISTAMINA	11
2.4 L'ISTAMINA NEGLI ALIMENTI	21
2.5 LE FLORE ISTAMINOGENE	23
2.6 TERRENI DI COLTURA PER BATTERI ISTAMINOGENI	26
Capitolo 3: Parte sperimentale	31
3.1 MATERIALI E METODI	31
3.1.1 Materiali usati	31
3.2 CAMPIONAMENTO	36
3.2.1 Modalità di campionamento	36
3.3 TERRENO DI NIVEN	39
3.4 SEAWATER AGAR MEDIUM	39
3.5 SEAWATER AGAR MEDIUM MODIFICATO	40
3.6 RISULTATI	48
Capitolo 4: Conclusioni	73
Capitolo 5: Riferimenti bibliografici	76
Capitolo 6: Webgrafia	85
Ringraziamenti	86

Capitolo 1

Introduzione

Le malattie alimentari sono patologie che si contraggono con l'assunzione di alimenti che contengono microrganismi patogeni, parassiti, contaminanti chimici e biotossine (Giaccone, 2012; WHO, 2008). Tra queste, per *intossicazioni alimentari* si intendono quelle malattie causate dal consumo di prodotti alimentari in cui sono presenti dosi tossiche di tossine preformate (Giaccone, 2012).

L'istaminosi o *Histamine Fish Poisoning* (HFP) è un'intossicazione alimentare dovuta all'accumulo negli alimenti di quantità considerevoli di istamina e probabilmente altre amine biogene. Questa malattia, come evidenziano i dati epidemiologici, ha un'ampia diffusione, sebbene il numero dei casi riportati sia largamente sottostimato poiché non tutti gli episodi vengono segnalati all'autorità sanitaria. La sintomatologia da essa provocata infatti, la maggior parte delle volte è blanda e quindi tale da non richiedere un intervento medico. L'istaminosi si contrae più spesso nei mesi caldi ed è causata principalmente dal consumo dei prodotti della pesca freschi o conservati. L'istamina si accumula anche in altre matrici alimentari come ad esempio i prodotti di salumeria, i prodotti lattiero-caseari e i prodotti vegetali fermentati, anche se le quantità più ingenti finora si sono ritrovate nel pesce. Questa amina si forma per effetto di un'eccessiva proliferazione microbica, ma solo le flore che possiedono l'enzima istidina-decarbossilasi sono in grado di trasformare l'istidina libera presente negli alimenti in istamina. Quindi sempre più elevato l'interesse verso l'isolamento e l'identificazione di questi batteri al fine di prevenirne la contaminazione degli alimenti e di conseguenza questa forma di intossicazione. Dal punto di vista analitico esistono svariate metodiche per la quantificazione chimica dell'istamina nelle matrici alimentari. L'unica tra queste ufficialmente riconosciuta dal Regolamento Comunitario n. 2073/2005 è la metodica in HPLC. Queste analisi hanno comunque come finalità la stima della quantità di istamina già formata

nell'alimento e quindi non forniscono informazioni riguardanti la flora istaminogena. Nell'ottica dell'igiene alimentare è necessario invece distinguere i batteri con capacità istamino-produttrici da quelli che non le possiedono ed identificarli.

L'unica tecnica finora diffusamente in uso è l'utilizzo in coltura di un agar specifico che dal nome dell'autore è stato chiamato terreno di Niven. La reazione cromatica che i microrganismi istaminogeni producono su questo substrato a volte è molto debole o comunque non sufficientemente evidente da permetterne un riconoscimento spiccato. La letteratura scientifica riporta inoltre numerosi altri problemi riscontrati nel suo impiego. In seguito a queste considerazioni sono stati più volte effettuati dei tentativi di sintesi di un terreno differenziale per i batteri istaminogeni dotato di maggior selettività e specificità. Nel 2009 Tao e colleghi hanno messo a punto un nuovo substrato di coltura per flore istaminogene, denominato *Seawater Agar Medium*, usato principalmente per l'analisi di campioni di acqua marina. Nella presente tesi, che si colloca nell'ambito della disciplina dell'igiene alimentare, si sono valutate l'efficacia e la sensibilità di questo terreno nella rilevazione ed evidenziazione dei batteri istamino-produttori presenti tipicamente nei prodotti della pesca. Con questa finalità il *Seawater Agar Medium* è stato messo a confronto con il terreno di Niven per verificare quale dei due fosse il più efficiente e per valutare la presenza di eventuali vantaggi o svantaggi nell'utilizzo dell'uno rispetto all'altro. Nello sviluppo di questa ricerca si è ritenuto inoltre necessario apportare alcune modifiche al terreno di Tao e colleghi, allo scopo di renderlo più funzionale al tipo di campionamento adottato e nel tentativo di aumentarne l'efficacia.

Capitolo 2

Rassegna bibliografica

2.1 LE MALATTIE ALIMENTARI

Le malattie alimentari sono forme morbose che l'uomo contrae assumendo alimenti che contengono microrganismi patogeni, parassiti, contaminanti chimici e biotossine (Giaccone, 2012; WHO, 2008). Le *foodborne diseases* comprendono un ampio spettro di disturbi e costituiscono un crescente problema di sanità pubblica nel mondo. La gravità di queste malattie nell'uomo varia da infezioni subcliniche con sintomi lievi a condizioni patologiche che ne minacciano la vita stessa.

Esse non solo condizionano la salute e il benessere delle persone, ma hanno anche pesanti conseguenze economiche per gli individui e la comunità (Schlundt, 2002).

Se da un lato sono stati apportati enormi miglioramenti negli standard igienici, dall'altro l'introduzione di pratiche, come ad esempio la pastorizzazione, ha alterato i tipi di malattie presenti nei paesi sviluppati. Negli ultimi decenni i complessi processi di produzione e trasporto degli alimenti hanno reso possibile l'entrata degli agenti patogeni a diversi livelli nella filiera alimentare: a livello della produzione primaria, della processazione e lavorazione delle matrici alimentari, del trasporto, dello stoccaggio e della distribuzione, per arrivare fino al contesto domestico (figura 2.1). Inoltre abitudini alimentari ormai globalizzate hanno esteso il potenziale geografico di diffusione dei patogeni permettendo il superamento dei confini tra le nazioni (Hall *et al.*, 2008).

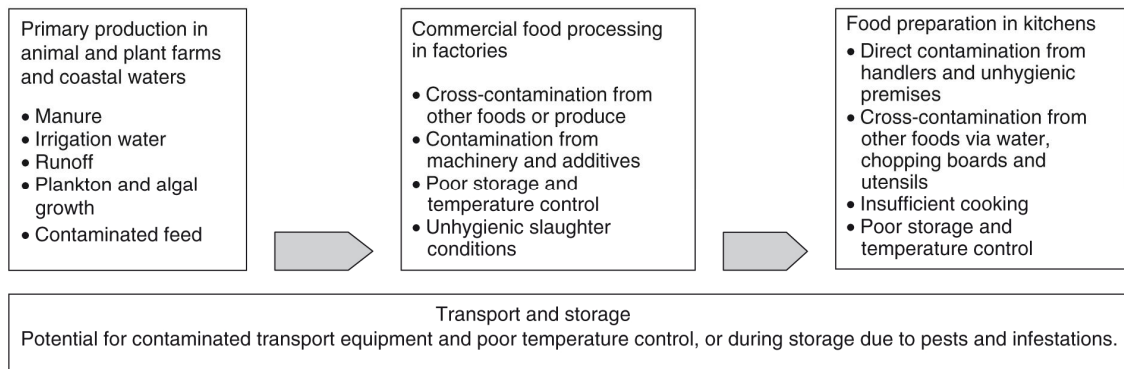


Figura 2.1 Punti di possibile contaminazione batterica durante la produzione primaria, la lavorazione e la preparazione degli alimenti. (Hall *et al.*, 2008)

Anche se i più eclatanti episodi di *foodborne diseases* attirano l'attenzione e l'interesse dell'opinione pubblica e dei sistemi di comunicazione mediatici, la maggior parte delle infezioni è costituita da casi isolati ed individuali, in cui spesso non è neppure possibile risalire ad una causa certa (Tauxe, 2001). Dato che molti casi di malattia alimentare non hanno una gravità sintomatologica tale da richiedere un intervento medico, solo alcuni tra questi raggiungono il sistema sanitario e un ancor più esiguo numero di questi ottengono una conferma laboratoristica. Ciò significa che il numero di casi confermati da test di laboratorio rappresenta solo una frazione dei casi reali (figura 2.2). Poiché la maggior parte degli episodi di malattia alimentare non è riportata, la vera entità del problema è tuttora sconosciuta (Schlundt, 2002).

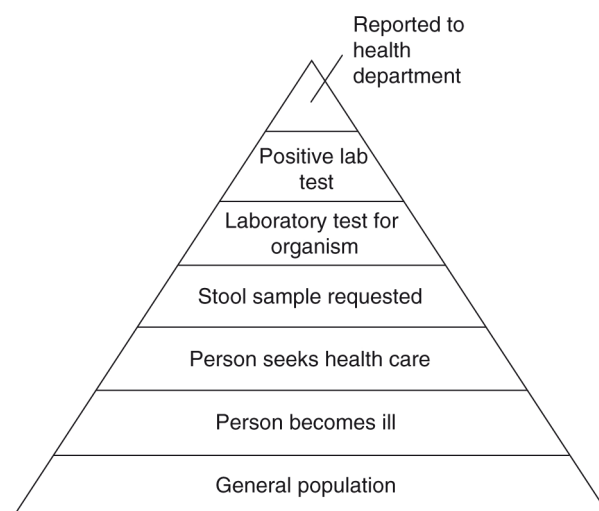


Figura 2.2 Grafico a piramide che illustra il divario tra il numero di casi reali di malattie alimentari presenti nella popolazione e il numero di questi che effettivamente viene segnalato alle autorità sanitarie fino a raggiungere il Ministero della Salute. (Hall *et al.*, 2008)

Le forme patologiche che derivano dall'ingestione di alimenti si suddividono in: *infezioni*, *tossinfezioni* ed *intossicazioni alimentari*. Le prime si contraggono quando l'alimento assunto contiene basse cariche del germe vivo e vitale (100-1000 ufc/g); è necessario invece che l'alimento ne contenga da 10^5 a 10^8 ufc/g per generare una tossinfezione. Infine per intossicazione alimentare si intende quella forma morbosa derivante dal consumo di alimenti che, anche in assenza del microrganismo, contengono dosi tossiche di tossine preformate (Giaccone, 2012). I più comuni sintomi clinici delle malattie alimentari sono rappresentati da disturbi gastrointestinali quali: nausea, dolore di stomaco, vomito e diarrea, ma esse possono portare anche a sintomi cronici e potenzialmente mortali incluse patologie neurologiche, ginecologiche e immunologiche, come pure a disfunzioni multi-organiche, neoplasie e morte. Le più frequenti complicazioni extraintestinali comprendono febbre, flogosi di singoli organi come epatite e artrite, affezioni del sistema nervoso centrale e periferico come meningite, encefalite, paresi, paralisi e parestesie, batteriemie, setticemie, aborto, sofferenza fetale e disfunzioni organiche quali collasso cardiaco ed insufficienza renale.

Dal "Eu summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks" (2012) emerge che il maggior numero di episodi di malattia alimentare documentato in quell'anno è stato causato da *Salmonella spp.* (28,6% di tutti gli episodi), seguito da tossine batteriche (14,5%), virus (14,1%) e *Campylobacter spp.* (9,3%).

Nonostante sia *Salmonella spp.* la causa più frequente di focolai di malattia alimentare, il numero di casi umani confermati di campylobatteriosi (214.268) è stato nettamente superiore a quello di salmonellosi (91.034).

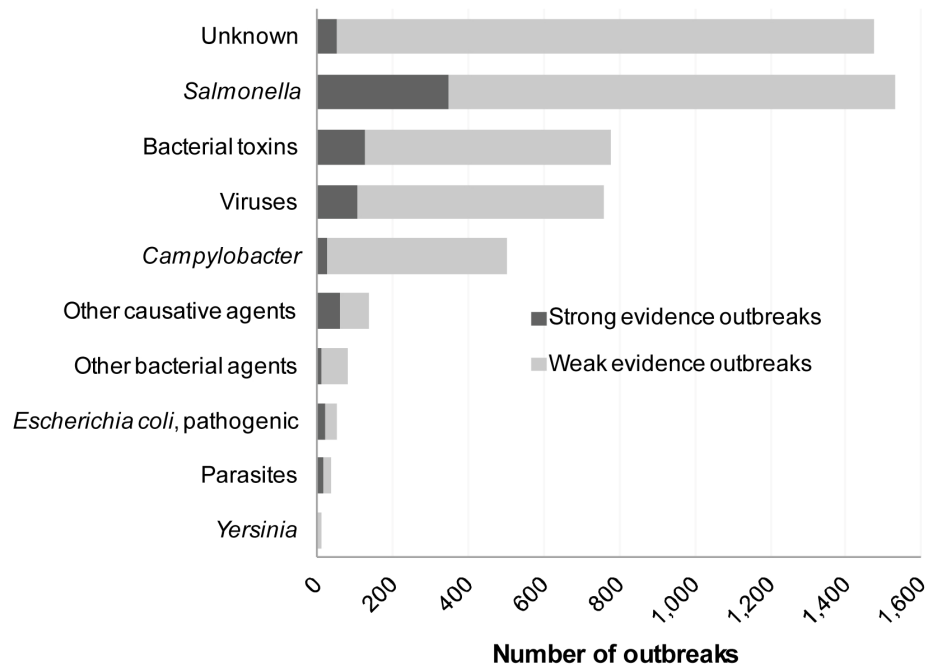


Figura 2.3 Distribuzione dei focolai di malattie alimentari presenti in UE nell'anno 2012 sulla base dell'agente causale. (EFSA, 2014)

Per quanto riguarda i dati relativi all'istaminosi il Report EFSA evidenzia che l'intossicazione da istamina non è così frequente come altre malattie alimentari, ma è comunque documentata. Nel 2012 la maggior parte (54,8%) degli *strong evidence outbreaks* dovuti ad altri agenti causali è stata provocata dall'istamina, totalizzandone il 50,4 % dei casi umani e il 35,9% delle ospedalizzazioni (tabella 2.1). Tutti i 34 episodi di intossicazione erano collegati al consumo di pesce e suoi prodotti.

Agent	Country	Strong-evidence outbreaks			
		N	Human cases		
			Cases	Hospitalised	Deaths
Histamine	Belgium	4	28	2	0
	Denmark	3	9	1	0
	France	13	62	6	0
	Latvia	1	16	-	0
	Slovenia	1	3	1	0
	Spain	8	101	1	0
	Sweden	2	15	-	-
	United Kingdom	2	7	3	0
	EU Total	34	241	14	0
Marine biotoxins	Belgium	2	110	0	0
	France	12	47	1	0
	Germany	1	-	-	-
	Spain	3	27	1	0
	EU Total	18	184	2	0
Mushroom toxins	Poland	1	3	3	0
	Spain	6	22	18	1
	EU Total	7	25	21	1
Mycotoxins	Denmark	2	26	0	0
	EU Total	2	26	0	0
Atropine	France	1	2	2	0
	EU Total	1	2	2	0

Tabella 2.1 Strong-evidence outbreaks dovuti ad altri agenti causali verificatisi in UE nell'anno 2012. (EFSA, 2014)

Anche Il RASSF, sistema di notifica e allerta rapido per i rischi connessi al consumo di alimenti o mangimi, riporta casi confermati o sospetti di intossicazione da istamina. Nel 2013 il documento prodotto per gli stati membri dell'Unione Europea ha messo in evidenza 7 possibili focolai di istaminosi; la maggior parte è stata segnalata dallo stato italiano e tutti gli episodi erano connessi al consumo di prodotti della pesca. Nello stesso anno sono stati emessi tre stati d'allerta, uno riguardante acciughe sottopio contenenti dosi elevate di istamina, gli altri due relativi uno al tonno in scatola e l'altro tonno refrigerato. L'importanza attribuita all'istaminosi da parte dell'UE all'interno del programma SEAFOODplus e al progetto BIOCOM (*Biogenic amines in seafood . assessment and management of consumer exposure*) ha permesso il monitoraggio di 16000 casi di intossicazione tra la metà degli anni 1960 e il 2005. Tra il primo report RASSF sull'istamina del 1979 e l'anno 2010 sono state registrate 357 notifiche riguardanti questa amina biogena.

L'Histamine Fish Poisoning (HFP), ovvero l'istaminosi, non ha un impatto grave sulla salute umana. Generalmente presenta una sintomatologia blanda ma spiacevole, che crea disagio solo per alcune ore. Questo fatto, unitamente ad una elevata frequenza di diagnosi errate e ad una ampia variabilità nella

suscettibilità individuale, comporta che la maggior parte dei casi non venga segnalata o venga confusa con casi di allergia alimentare (Taylor, 1989). La morbilità si avvicina al 100% quando vi è stato il consumo di pesce contenente elevate quantità di istamina, mentre i casi di morte sono molto rari (Lehane e Olley, 2000).

2.2 LqSTAMINOSI

Lqistaminosi è unqintossicazione alimentare acuta causata principalmente dal consumo di prodotti ittici contenenti alti livelli di istamina e probabilmente altre amine biogene.

Lqistamina si forma grazie alla azione enzimatica di flore microbiche che decarbossilano lqistidina libera presente in alcuni alimenti. Nellquomo lqistamina è normalmente presente e viene sintetizzata a partire dallqistidina grazie allqenzima L-istidina decarbossilasi contenente piridossal fosfato (figura 2.4). Essa si trova a livello di: mastociti, basofili, piastrine, neuroni istaminergici e cellule enterocromaffini. Il suo ruolo fisiologico comprende la secrezione gastrica, la crescita e la differenziazione cellulare. Interviene inoltre nei ritmi circadiani e nei meccanismi di attenzione e apprendimento (Mainz e Novak, 2007; Jarisch, 2004; Jorgensen et al., 2007).

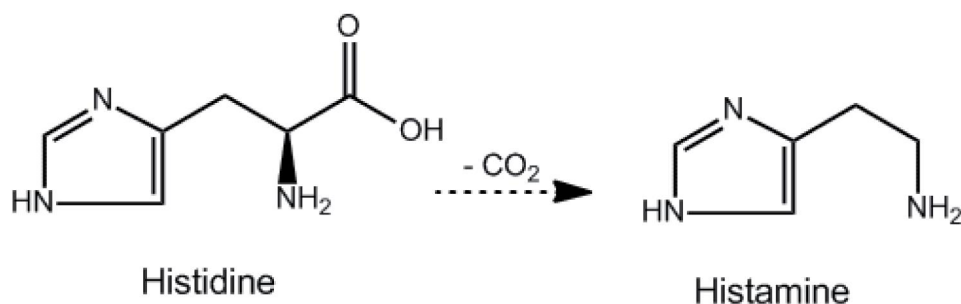


Figura 2.4 Conversione dellqistidina in istamina per mezzo dellqenzima istidina-decarbossilasi. (Cattaneo, 2011)

La letteratura scientifica suggerisce che responsabile della sindrome istaminica non sia solamente lqassunzione di alimenti contenenti elevate dosi di istamina. Lquomo, infatti, può tollerare fino a 180 mg di istamina pura somministrata *per os* senza presentare sintomi evidenti, mentre la somministrazione intravenosa

di 0,007 mg della stessa sostanza ha un effetto vasodilatatorio e tachicardizzante.

È stato quindi postulato che gli enzimi metabolizzanti l'istamina esogena nell'apparato digerente ne prevengano l'assorbimento e il passaggio nel sistema circolatorio.

Nell'uomo l'istamina è metabolizzata principalmente da due enzimi: la diaminossidasi (DAO) presente soprattutto a livello intestinale e l'istamina-N-metiltrasferasi (HMT) presente in diversi organi (fegato, colon, milza, polmone, piccolo intestino, stomaco). DAO e HMT convertono l'istamina in metaboliti di minor tossicità che vengono escreti prevalentemente con le urine: la DAO la converte in acido imidazolacetico, mentre HMT in metilistamina, che a sua volta diviene acido metilimidazolacetico grazie all'azione dell'enzima MAO (Taylor, 1986; Maintz e Novak, 2007).

I meccanismi coinvolti nella patogenesi dell'istaminosi sono a tutt'oggi oggetto di ricerca. Alcuni studi hanno suggerito l'esistenza nel pesce di potenziatori dell'istamina che, inibendone competitivamente gli enzimi di detossificazione, ne abbassano la dose soglia necessaria a provocare l'intossicazione. Molti ricercatori individuano in altre amine biogene come cadaverina, putrescina, tiamina e tiramina, le sostanze responsabili di questo potenziamento (Al Bulushi *et al.*, 2009; Bjeldanes *et al.*, 1978; Taylor, 1986; Taylor e Lieber, 1979; Lyons *et al.*, 1983; Mongar, 1957). Secondo altri autori ciò avviene invece per una loro azione di interferenza con la barriera intestinale. Quando l'istamina in quantità elevate entra nel sistema cardio-circolatorio, compaiono i sintomi di intossicazione. Nell'uomo essi si manifestano rapidamente da 5 minuti a 2 ore dall'ingestione dell'alimento e permangono usualmente 8-12 ore non superando quasi mai le 24 ore (WHO, 2013). L'istamina agisce sui recettori H1 e H2 presenti nell'organismo, producendo un'azione vasodilatatrice periferica che esita in arrossamento cutaneo localizzato o diffuso, calo delle resistenze periferiche e ipotensione sistemica. Essa induce inoltre un'alterazione della permeabilità capillare che determina la fuoriuscita di plasma dal comparto vasale e conseguentemente emocoagulazione, edema facciale e orticaria. Il coinvolgimento dei recettori H1 presenti a livello della muscolatura liscia del tratto gastroenterico ne induce la contrazione spastica accompagnata da crampi, diarrea, nausea e vomito. Il

legame con i medesimi recettori situati sull'albero bronchiale provoca broncospasmo, dispnea e possibili crisi asmatiche negli individui già predisposti, mentre a livello di vie sensitive e motorie esplica un'azione stimolante generando prurito e bruciore (Owen *et al.*, 1980; Shahid *et al.*, 2009; Taylor, 1986; Nuutinen e Panula, 2010; Catellani, 1996).

La gravità della risposta clinica dipende dalla quantità di amine ingerite e dalla sensibilità individuale. Quest'ultima è condizionata anche da dieta, assunzione di farmaci e da patologie concomitanti. Molti studi hanno rilevato un'alterazione nel metabolismo dell'istamina in individui che assumono alcol, isoniazide o droghe che inibiscono gli enzimi MAO e DAO, come anche in pazienti affetti da mastocitosi, tumori e leucemia mieloide cronica (Mainz e Novak, 2007).

È ancora oggetto di discussione la minima dose di istamina che produce effetti tossici, perché nel pesce possono essere presenti potenziatori di tossicità che ne abbassano la soglia.

Un'altra difficoltà si presenta nell'analisi dei campioni legati ai casi di istaminosi perché la concentrazione di istamina varia sia da esemplare ad esemplare all'interno di uno stesso lotto di pesce sia tra le diverse porzioni di uno stesso pesce.

Le dosi tossiche proposte da Bartholomew (1987) e da Dalgaard (2008) sono riportate nella seguente tabella:

Histamine concentration	Fish quality	Health effects	Reference
<50 mg/kg	normal	safe for consumption	Bartholomew et al., 1987
50-200 mg/kg	mishandled	possibly toxic	Bartholomew et al., 1987
200-1000 mg/kg	unsatisfactory	probably toxic	Bartholomew et al., 1987
≥500 mg/kg	not reported	toxic	Dalgaard et al., 2008
>1000 mg/kg	unsafe	toxic	Bartholomew et al., 1987

Tabella 2.2 Diverse concentrazioni di istamina ritrovate in campioni di pesce e legate ad episodi di istaminosi. (EFSA, 2011)

Shalaby (1996) invece ha fornito differenti livelli di riferimento riguardanti il contenuto di istamina nel pesce: <5 mg/100 g sono considerati sicuri per il consumo; 5-20 mg/100 g possono essere tossici; 20-100 mg/100 g sono probabilmente tossici; > 100 mg/100 g sono considerati tossici e non salubri.

L'unico trattamento previsto per l'istaminosi è la somministrazione di anti-istaminici.

Per quanto riguarda i sistemi di prevenzione dell'intossicazione da istamina essi riguardano principalmente il rispetto delle buone prassi igieniche e il mantenimento della catena del freddo. Il raffreddamento rapido del pesce rappresenta la strategia migliore, soprattutto per la fauna ittica che proviene da acque temperate o calde e per gli esemplari di grosse dimensioni. Alla cattura deve quindi seguire un ottimale rispetto delle temperature di raffreddamento fino alla cucina. L'HPF infatti si presenta nei prodotti crudi specialmente quando essi subiscono un abuso termico. Le linee guida suggeriscono inoltre il raffreddamento vicino al punto di congelamento. Per le altre tipologie di prodotti sono necessari campionamenti e analisi per verificare che i controlli siano stati applicati in modo corretto (Cattaneo, 2001; WHO, 2012).

2.3 LdSTAMINA

L'istamina (figura 2.5) è una diamina eterociclica appartenente alle amine biogene, composti organici azotati basici, di basso peso molecolare e aventi attività biologica.

Heterocyclic amines

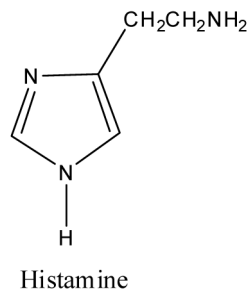


Figura 2.5 Istamina (EFSA, 2011)

L'istamina si trova normalmente in molti tessuti, in cui si forma a partire dall'istidina libera grazie all'azione dell'enzima istidina-decarbossilasi; quest'ultimo può essere anche prodotto da microrganismi presenti in svariati alimenti e che in particolare possono essere ritrovati nel pesce a causa di una contaminazione che può avvenire in mare o successivamente alla pesca.

Il muscolo dei pesci inoltre contiene una quantità di istidina libera superiori alla muscolatura degli altri animali terrestri (Giaccone, 2013).

Questo è il motivo per cui l'istamina si forma ed accumula preferenzialmente nelle diverse specie ittiche anziché in altre matrici alimentari.

L'istamina è altamente termostabile e non è denaturata dai trattamenti di cottura e di inscatolamento: per una sua completa inattivazione è necessario un trattamento di 90 minuti a 116 °C o di 180 minuti a 102 °C (Ienistea, 1971; Ienistea, 1973).

Elevate concentrazioni di questa amina non sono normalmente presenti nella muscolatura dei pesci e per raggiungerle sono necessari determinati fattori ambientali e microbiologici. La compresenza di queste condizioni è il vero elemento cardine della «sindrome da istamina»:

- 1) la disponibilità del substrato aminoacidico, ovvero la concentrazione di istidina libera: essa è distribuita in modo omogeneo nella muscolatura del pesce, ma le sue concentrazioni variano nelle differenti specie ittiche (tabella 2.3). L'aminoacido libero ha funzione di agente tamponante nel tessuto muscolare (Cattaneo, 2011);

Tabella 2.3 Valori di istidina libera per ciascuna specie ittica. (WHO, 2012)

Market name	Scientific name		Histidine levels (mg/kg)	Mean annual production (tonne, 2006-10) ^c
	Family ^a	Genus and species ^b		
Amberjack or Yellowtail	Carangidae	<i>Seriola</i> spp.		158 743
Yellowtail Amberjack		<i>Seriola lalandi</i>	7 320 ⁱ	719
Amberjack, Japanese		<i>Seriola quinqueradiata</i>	2 470-11 600 ^{h,k,l}	152 893
Yellowtail, Longfin		<i>Seriola rivoliana</i>		
Greater/Japanese Amberjack or Rudder Fish		<i>Seriola dumerili</i>	2 860 ⁱ	2 895
Anchovy	Engraulidae	<i>Anchoa</i> spp.		
		<i>Anchoviella</i> spp.		
Anchoveta, Pacific		<i>Cetengraulis mysticetus</i>		
		<i>Engraulis</i> spp.		
Peruvian		<i>Engraulis ringens</i>		6 630 951
European		<i>Engraulis encrasicolus</i>	6 210 ^{m,n}	534 483
South African		<i>Engraulis capensis</i>		209 250
Japanese	<i>Engraulis japonicus</i>	4 810 ^o	1 287 215	
		<i>Stolephorus</i> spp.		279 139
Bluefish	Pomatomidae	<i>Pomatomus saltatrix</i>		
Bonito	Scombridae			
Leaping		<i>Cybiosarda elegans</i>		
Dogtooth Tuna		<i>Gymnosarda unicolor</i>		669
Plain		<i>Orcynopsis unicolor</i>		759
		<i>Sarda</i> spp.		62 215
Lesser Eel or Small Sandeel	Ammodytidae	<i>Ammodytes tobianus</i>		
		<i>Ammodytes</i> spp.		337 923
		<i>Ammodytes personatus</i>		215 806
Escolar or Oilfish or Gemfish	Gempylidae	<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>	8 000-11 000 ^{q,r}	163
		<i>Ruvettus prestiosus</i>		25 561

Market name	Scientific name		Histidine levels (mg/kg)	Mean annual production (tonne, 2006-10) ^c
	Family ^a	Genus and species ^b		
Garfish	Belonidae	<i>Belone belone</i> ^e	6 084-6 685 ^s	
Herring or Sea Herring or Sild	Clupeidae	<i>Alosa</i> spp.		
Alewife or River Herring		<i>Alosa pseudoharengus</i>		5 286
Herring, Red-eye Round Tardoore		<i>Etrumeus teres</i>		
		<i>Opisthopterus tardoore</i>		
		<i>Clupea</i> spp.		
Herring, Atlantic		<i>Clupea harengus</i>	1 230-2 950 ^{t,u}	2 356 990
Herring, Araucanian		<i>Clupea bentincki</i>		624 528
Herring, Pacific		<i>Clupea pallasii pallasii</i>		306 839
Herring, Thread		<i>Opisthonema</i> spp.		18 717
Herring, Pacific Thread		<i>Opistonema libertae</i>		199 899
		<i>Harengula</i> spp.		
Herring, Pacific Flatiron		<i>Harengula thrissina</i>		
Herring, Silver-stripe Round		<i>Spratelloides gracilis</i>		243
	Pristigasteridae	<i>Ilisha</i> spp.		115 921
Indian Pellona		<i>Pellona ditchela</i>		16 865
Jack	Carangidae	<i>Caranx</i> spp.		
Jack or Blue Runner		<i>Caranx crysos</i>		6 473
		<i>Caranx georgianus</i>	1 800-6 300 ^v	
		<i>Carangoides bartholomaei</i>		
		<i>Oligoplites saurus</i>		
		<i>Selene</i> spp.		9 163
		<i>Urapsis secunda</i>		
Jack or Crevalle		<i>Alectis indicus</i>		
Jack or Rainbow Runner	<i>Elagatis bipinnulata</i>	7 090 ⁱ	17 476	
Jack or Roosterfish	<i>Nematistius pectoralis</i>			
Kahawai/Western Australian Salmon	Arripidae	<i>Arripis</i> spp.		5 734

Market name	Scientific name		Histidine levels (mg/kg)	Mean annual production (tonne, 2006-10) ^c
	Family ^a	Genus and species ^b		
Kahawai		<i>Arripis trutta</i>	12 420 ^v	
Kohera or Yellowtail	Carangidae	<i>Decapterus koheru</i>	2 300-2 700 ^v	
Mackerel				
Mackerel, Frigate	Scombridae	<i>Auxis tapeinocephalus</i>	14 600 ^l	
Butterfly Kingfish		<i>Gasterochisma melampus</i>		12
		<i>Grammatorcynus</i> spp.		
		<i>Pneumatophorus diego</i>	5 193-5 999 ^w	
Mackerel, Short		<i>Rastrelliger brachysoma</i>		311 455
Mackerel, Indian		<i>Rastrelliger kanagurta</i>		274 301
		<i>Scomber</i> spp.		
Mackerel, Atlantic		<i>Scomber scombrus</i>	2 000-4 500 ^{t,x,y}	664 231
Mackerel, Chub		<i>Scomber japonicus</i>	1 063-8 020 ^{k,w,z}	1 767 202
Mackerel, Blue		<i>Scomber australasicus</i>	2 600 ^v	10 364
Mackerel, Spanish		<i>Scomberomorus</i> spp.		
Mackerel, Narrow-Barred Spanish		<i>Scomberomorus commerson</i>		228 458
Mackerel, Spanish or King		<i>Scomberomorus cavalla</i>		13 508
Mackerel, Japanese Spanish		<i>Scomberomorus niphonius</i>	1 990- 2 180 Murata <i>et al.</i> , 1994	60 950
Mackerel, Jack	Carangidae	<i>Trachurus</i> spp.		
Mackerel, Cape Horse		<i>Trachurus capensis</i>		251 277
Mackerel, Jack		<i>Trachurus novaezelandiae</i>	2 720 ^v	
Mackerel, Horse		<i>Trachurus japonicus</i>	172-3 680 ^{k,z}	278 404
Mackerel, Atlantic Horse		<i>Trachurus trachurus</i>		209 971
Mackerel, Chilean Jack		<i>Trachurus murphyi</i>		1 493 793
Mackerel, Atka	Hexagrammidae	<i>Pleurogrammus monopterygius</i>		62 282
Mackerel, Okhotsk Atka		<i>Pleurogrammus azonus</i>	2 500 Fujii 1954	185 719
Mahi-Mahi (Dolphin Fish)	Coryphaenidae	<i>Coryphaena hippurus</i>	1 829-9 370 ^{j,k,aa,ab,ac}	52 642

Market name	Scientific name		Histidine levels (mg/kg)	Mean annual production (tonne, 2006-10) ^c
	Family ^a	Genus and species ^b		
Marlin	Istiophoridae	<i>Makaira</i> spp.		39 285
Marlin, Black		<i>Makaira mazara</i>	7 630 ^l	
Marlin, Striped		<i>Makaira mitsukurii</i>	8 310-13 200 ^{i,k}	
		<i>Tetrapturus</i> spp.		
Menhaden	Clupeidae	<i>Brevoortia</i> spp.		
Gulf		<i>Brevoortia patronus</i>		435 914
Atlantic		<i>Brevoortia tyrannus</i>	1 860-2 790 ^w	199 658
Pacific		<i>Ethmidium maculatum</i>		26 839
Milkfish	Chanidae	<i>Chanos chanos</i> ^f	4 410-5 340, 25 070 ^{ad,ae}	
Mullet, Flathead Grey	Mugilidae	<i>Mugil cephalus</i>	2 060-7 600 ^v ,	
Pilchard or Sardine	Clupeidae			
Sardine, European		<i>Sardina pilchardus</i>	2 888 ^{af,ag}	1 101 842
Spotted Sardinella		<i>Amblygaster sirm</i> ^h		
		<i>Sardinella</i> spp.		
Sardine, Round		<i>Sardinella aurita</i>		357 275
Sardine, Indian Oil		<i>Sardinella longiceps</i>		408 305
Sardinella, Goldstripe		<i>Sardinella gibbosa</i>		178 156
Sardinella, Madeiran		<i>Sardinella maderensis</i>		137 814
		<i>Sardinops</i> spp.		
Pilchard, Japanese or South American or Californian		<i>Sardinops sagax</i>	1 227-7 626 ^{k,w,z}	837 504
Piper	Hemiramphidae	<i>Hyporhamphus</i> ^{thi}	3 200 ^v	
Queenfish, Talang	Carangidae	<i>Scomberoides</i> spp. ^l		
		<i>Scomberoides com- mersonnianush</i>		
Sailfish	Istiophoridae	<i>Istiophorus platypterus</i>	7 630 ^{ah}	
Salmon	Salmonidae	<i>Salmo</i> or <i>Oncorhynchus</i> spp.		
Atlantic Salmon		<i>Salmo salar</i>	130-300 ^{ai,aj,ak}	
Chinook Salmon		<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	70-288 ^{ak,al}	

Market name	Scientific name		Histidine levels (mg/kg)	Mean annual production (tonne, 2006-10) ^c
	Family ^a	Genus and species ^b		
Chum Salmon		<i>Oncorhynchus keta</i>	70-670 ^{ak,am}	
Coho Salmon		<i>Oncorhynchus kisutch</i>	219-970 ^{ak,al}	
Amago Salmon		<i>Oncorhynchus macrostomus</i>	188-441 ^{ak}	
Cherry Salmon		<i>Oncorhynchus masou</i>	387-2362 ^{ak}	
Sockeye Salmon		<i>Oncorhynchus nerka</i>	240-590 ^{ak,al}	
Pink Salmon		<i>Oncorhynchus gorbusvha</i>	408-1 557 ^{ak,al}	
Saury	Scomberesocidae			
Pacific		<i>Cololabis saira</i>	16 100k	
Atlantic		<i>Scomberesox saurus saurus</i>		
Shad	Clupeidae	<i>Alosa</i> spp.		
Bonga		<i>Ethmalosa fimbriata</i>		212 076
Shad, Gizzard		<i>Dorosoma</i> spp.		
Shad, Western Australian Gizzard		<i>Nematalosa vlaminghi</i>		
Shad, Hilsa		<i>Tenualosa ilisha</i>		343 058
Spearfish	Istiophoridae	<i>Tetrapturus</i> spp.		
Sprat or Bristling	Clupeidae	<i>Sprattus</i> spp.		
Blueback		<i>Sprattus antipodum</i>	3 900 ^y	
Swordfish	Xiphiidae	<i>Xiphias gladius</i> ^z		
Trevally	Carangidae	<i>Caranx</i> spp. <i>Caranx georgianus</i>	1 800-6 300 ^y	
Tuna (Small)	Scombridae			
Slender		<i>Allothunnus fallai</i> <i>Auxis</i> spp.		
Bonito		<i>Auxis thazard</i> <i>Euthynnus</i> spp.	4 330-10 100 ^k	
Little Tuna or Kawakawa		<i>Euthynnus affinis</i>	10 900 ^j	
Skipjack		<i>Katsuwonus pelamis</i>	13 400-20 000 ^{i,w,z,an}	2 529 408
Longtail Tuna		<i>Thunnus tonggol</i>	11 540 ^{an}	239 661
Tuna (Large)	Scombridae	<i>Thunnus</i> spp.		
Albacore		<i>Thunnus alalunga</i>	4 600-6 790 ^{po}	

Market name	Scientific name		Histidine levels (mg/kg)	Mean annual production (tonne, 2006-10) ^c
	Family ^a	Genus and species ^b		
Yellowfin		<i>Thunnus albacares</i>	2 123-12 200 ^{i,w,ab,ap}	1 113 954
Blackfin		<i>Thunnus atlanticus</i>		
Southern Bluefin		<i>Thunnus maccoyi</i>	6 670 ^j	
Big-eye Tuna		<i>Thunnus obesus</i>	7 450 ^j	
Pacific Bluefin Tuna		<i>Thunnus orientalis</i>	6 850-7 110 ^{oo}	
Atlantic Bluefin		<i>Thunnus thynnus</i>		
Wahoo	Scombridae	<i>Acanthocybium solandri</i>		
Yellowtail or Amberjack or Kingfish ^b	Carangidae	<i>Seriola lalandi</i>	5 500-15 800 ^v	

2) la specie ittica: dalla Unione Europea e nel Codex Alimentarius sono state dichiarate a rischio le specie ittiche appartenenti alle seguenti famiglie: *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae* e *Scomberesocidae* (Codex Alimentarius Commission, 1999). Si è evidenziato in queste specie che, a differenza della distribuzione uniforme dell'istidina, quella dell'istamina varia a seconda della regione anatomica. La gran parte dei microrganismi istaminogeni si trova sulla superficie del pesce (52,6%), in misura decrescente nei visceri (33,0%) e nel tessuto muscolare (3,1%). L'intestino è provvisto di enzimi proteolitici che, qualora venga distrutta la parete addominale, degradano i tessuti limitrofi. Nelle prime 24 ore l'istamina si forma prevalentemente nelle parti anteriori del pesce, presumibilmente in quanto sono le aree adiacenti alle branchie e all'intestino, che costituiscono i principali serbatoi dei batteri istaminogeni. Dopo la morte del pesce questi microrganismi moltiplicano e diffondono in senso cranio-caudale. Per quanto riguarda in particolare le carni di *Thunnus alalunga* l'istamina è stata ritrovata in concentrazioni più ingenti nella muscolatura sottostante il tegumento e nelle porzioni attigue alla cavità celomatica, con un decremento invece nelle parti prossime alla colonna vertebrale (Giaccone et al., 2000). La formazione di istamina inoltre, sebbene rappresenti una forma di deterioramento del pesce, precede il cambiamento delle caratteristiche

organolettiche poiché essa viene prodotta anche prima che si riscontri la presenza di ammoniaca dovuta alla proteolisi;

- 3) la presenza di microrganismi in grado di decarbossilare l'istidina: i batteri istaminogeni costituiscono normalmente solo l'1% della flora microbica nel pesce; la maggior parte di essi infatti deriva da una contaminazione post cattura (Cattaneo, 2011). Per la formazione dell'istamina è necessario che il microrganismo abbia il potenziale genetico per la produzione dell'enzima istidina-decarbossilasi. Esso inoltre è un enzima di tipo adattativo, ovvero viene sintetizzato solamente qualora vi sia dell'istidina libera come substrato disponibile. Si è notato che i ceppi istaminogeni possono perdere nel tempo la capacità di formare istamina in seguito ad isolamento in terreni di coltura senza istidina (Tiecco *et al.*, 1984). Sono infine indispensabili per il compimento della reazione la fine della fase di moltiplicazione batterica e adeguati valori di pH e temperatura. La flora microbica istaminogena si riscontra in numero più elevato durante la vita del pesce rispetto alla fase post mortale; questo avviene perché in seguito alla morte dell'esemplare i batteri produttori di istamina non aumentano quantitativamente, mentre invece aumenta la flora non produttrice di istamina (Arnold e Brown, 1978; Eitenmiller e De Souza, 1984);
- 4) il pH: il pH del substrato svolge un ruolo chiave sia nella sintesi dell'istidina-decarbossilasi che nella sua attività. A pH 5,0 si assiste da una parte alla massima produzione dell'enzima, dall'altra alla minima crescita cellulare. La più forte spinta per la crescita della flora batterica è data da valori di pH compresi tra 5,5 e 8,5, mentre proprio a 8,5 si ha la minima quantità di enzima formato. A pH 6,5 si ha la massima attività dell'enzima istidina-decarbossilasi; proprio a quest'ultimo valore si avvicina il pH della muscolatura del pesce, costituendo un ottimo ambiente per l'accumulo di istamina. In un terreno di coltura per batteri istaminogeni è quindi fondamentale raggiungere un valore di pH compreso tra 5,3 e 6,0. Questo intervallo è stato calcolato cercando un equilibrio tra la sintesi dell'enzima e la sua attività (Ienistea, 1971;

Eitenmiller *et al.*, 1981; Eitenmiller e De Souza, 1984; Ababouch *et al.*, 1991; Ababouch *et al.*, 1986; Arnold e Brown, 1978; Niven *et al.*, 1981; Yoshinaga a Frank, 1982);

- 5) la temperatura di conservazione, la durata dell'eventuale esposizione ad abusi termici e la mancanza dell'applicazione delle buone norme igieniche. Per quanto riguarda la temperatura, l'optimum per la produzione di amine biogene da parte di batteri mesofili si attesta tra i 20 e i 37 °C, mentre si riduce al di sotto dei 5 e sopra i 40 °C (EFSA, 2011);
- 6) i carboidrati: la presenza di carboidrati ed in particolare del glucosio induce la fermentazione da parte dei microrganismi e conseguentemente la produzione di acidi e la diminuzione del pH. La flora batterica inoltre necessita di carboidrati per la biosintesi e la produzione dell'istidina-decarbossilasi (Arnold e Brown, 1978; Jenstea, 1973);
- 7) NaCl: influenza l'attività enzimatica coinvolta nella produzione di amine biogene. Diversi studi riportano che la presenza del cloruro di sodio ha effetto inibente o stimolante a seconda della specie di microrganismo preso in considerazione (Taylor e Woychik, 1982; Taylor e Speckard, 1984; Hernandez-Herrero *et al.*, 1999; Rodriguez-Jerez *et al.*, 1994);
- 8) istaminasi: un ingente numero di batteri Gram negativi possiede enzimi istaminolitici la cui attività è massima a pH 7. Negli alimenti che contengono elevate concentrazioni di istamina la presenza di questi enzimi ha un'importanza basilare nella creazione di un equilibrio tra la produzione e la degradazione di questa amina (Jenstea, 1971; Matsumiya e Otake, 1981).

2.4 L'ISTAMINA NEGLI ALIMENTI

Nell'uomo gli episodi di istaminosi sono più frequentemente associati al consumo dei prodotti della pesca poiché in questi ultimi sono compresenti molti dei fattori che favoriscono la formazione e l'accumulo di istamina. Altri alimenti contengono quantità varie di questa amina biogena. La maggior parte dell'istamina viene sintetizzata infatti a partire dall'istidina presente in forma libera, ma anche i processi microbici di putrefazione, scindendo i composti presenti nelle matrici alimentari, possono fornire un'ulteriore quantità di istidina. Sono quindi considerati in grado di accumulare istamina anche tutti gli alimenti che vengono lavorati a partire da materie prime di scarsa qualità microbiologica o a partire da materie prime fermentate per azione di specifici fermenti lattici, nonché gli alimenti che vengono sottoposti ad una fase di maturazione in cui possono svilupparsi microrganismi con attività decarbossilante (Giaccone, 2013; Rodriguez-Jerez *et al.*, 1994). Le altre categorie alimentari che mostrano i più alti livelli medi di istamina sono i prodotti vegetali fermentati (39,4 - 42,6 mg/kg), i prodotti lattiero-caseari (20,9 - 62 mg/kg), i salami crudi (23,0 - 23,6 mg/kg) e in quantità minore le bevande spiritose (EFSA, 2011).

Tabella 2.4 Valori medi di istamina (mg/kg) in varie matrici alimentari. %n+ indica il numero di campioni, mentre %ND+la percentuale dei valori non individuati. (EFSA, 2011)

Food category	Sub-category	n	ND	Mean
Alcoholic beverages	Beer	188	9.6%	1.4
	Fortified and liqueur wines	28	32%	1.1
	Wine, red	300	10%	3.6 – 3.7
	Wine, white	225	22%	0.8 – 0.9
	Wine, white, sparkling	45	73%	1
<i>Total for alcoholic beverages</i>		786	18%	2 – 2.1
Sauces	Fish sauce	72	14%	196 – 197
	Other savoury sauces	27	96%	0.5 – 10.1
<i>Total for sauces</i>		99	36%	142 – 146
Fish and fish products	Dried anchovies	54	50%	348
	Fermented fish products	71	45%	7.7 – 11.4
	Other fish and fish products	6329	73%	26.8 – 31.2
<i>Total for fish and fish products</i>		6454	73%	29.3 – 33.6
Meat products	Fermented sausages	374	43%	23.0 – 23.6
	Other ripened meat products	94	28%	5.9 – 6.4
	Other meat products	75	80%	3.9 – 4.4
<i>Total for meat products</i>		543	45%	17.4 – 17.9
Dairy products	Cheese	2143	85%	20.9 – 62
	Fresh cheese	98	93%	3.2 – 38.5
	Hard cheese	1067	83%	25.2 – 65.1
	Washed rind cheese	296	93%	8.5 – 54.4
	Blue cheese	678	85%	21.8 – 63.8
	Acid curd cheese	4	25%	51.3 – 55.3
	Yoghurt	7	14%	0.5
Other dairy products	4	50%	0.3	
<i>Total for dairy products</i>		2154	85%	20.8 – 61.6
Vegetables and vegetable products	Fermented vegetables	9	44%	39.4 – 42.6
	Other vegetables	26	96%	2.9 – 3.1
<i>Vegetables and vegetable products</i>		35	83%	12.3 – 13.3

Nel 1981 Karmas ha introdotto un indice per la valutazione della qualità degli alimenti proteici basato sulla quantificazione delle amine biogene. L'indice B.A.I. (*Biogenic Amine Index*) è basato sul rapporto tra la somma delle amine biologicamente attive, ovvero cadaverina, putrescina e istamina e quelle di provenienza fisiologica coinvolte quasi esclusivamente nel metabolismo di crescita cellulare endogena (spermidina e spermina). Se l'indice è inferiore a 1 la matrice alimentare è di ottima qualità, se è compreso tra 1 e 10 è sospetta di

iniziale alterazione, se è superiore a 10 bisogna fondatamente sospettare un'alterazione del prodotto.

Dato che l'istamina è frequentemente causa di intossicazione alimentare, l'Unione Europea considera il composto come facente parte dell'elenco di agenti patogeni che devono essere controllati negli alimenti secondo i criteri di sicurezza contenuti nel Regolamento CE n. 2073/05. Un altro Regolamento, il CE n. 1441/07 stabilisce dei criteri di sicurezza riguardanti i prodotti della pesca ottenuti da specie ittiche associate ad un tenore elevato di istidina, ovvero relativi a quelle specie che appartengono alle famiglie *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* e *Scomberesocidae*. In esso si prevede che venga sottoposto ad analisi un campione composto da 9 unità campionarie di cui:

- 7 unità campionarie su 9 non devono presentare più di 100 mg/kg di istamina;
- un massimo di 2 unità campionarie può superare i 100 mg/kg, ma nessuna deve superare i 200 mg/kg.

Il Regolamento si estende anche agli esemplari appartenenti alle famiglie sopra citate che hanno subito invece maturazione enzimatica:

- in 7 unità campionarie su 9 il tenore di istamina deve risultare inferiore a 100 mg/Kg;
- 2 unità campionarie delle 9 sottoposte ad analisi possono avere un contenuto di istamina compreso tra 200 e 400 mg/kg;
- nessun campione deve superare il valore di 400 mg/kg.

2.5 FLORE ISTAMINOGENE

Behling e Taylor nel 1982 hanno suddiviso i batteri istaminogeni in due categorie. Alla prima appartengono le specie capaci di produrre grandi quantità di istamina (oltre 100 mg/100 ml di brodo di coltura contenente tonno) con un periodo di incubazione inferiore a 24 ore e a temperature superiori ai 15 °C. Alla seconda categoria appartengono, invece, le specie capaci di produrre minori quantità di istamina (<25 mg/100 ml) con tempi di incubazione superiore alle 48 ore e ad una temperatura di circa 30 °C. All'interno di una stessa specie inoltre, non tutti i ceppi possiedono il corredo genetico per la produzione dell'enzima istidina-decarbossilasi. Eitenmiller e coll. (1981, 1982) hanno condotto una

ricerca sui fattori che influenzano la produzione dell'enzima da parte di *Morganella morganii*. L'analisi di 22 ceppi ha rivelato che ognuno di essi possiede un'attività istidino-decarbossilante, ma a livelli variabili. Diversamente da quanto riscontrato per *Morganella morganii*, solo alcuni ceppi di *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alvei* sono considerati forti produttori di istamina (Havelka, 1967; Taylor *et al.*, 1978; Taylor *et al.*, 1979). La flora istaminogena comprende una ampia varietà di specie microbiche che si possono raggruppare secondo differenti classi termiche. Nel seguente grafico le radici quadrate del tasso di crescita microbica sono messe in relazione alla temperatura di crescita. Il gruppo A comprende batteri decarbossilanti l'istidina che hanno come *optimum* di crescita la temperatura di refrigerazione, come ad esempio *Photobacterium phosphoreum*; il gruppo B include microrganismi come alcune specie di *Vibrio* per i quali la massima crescita si ha ad una temperatura compresa tra i 25 e i 30 °C; nel gruppo C si ritrovano specie come *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* e *Hafnia alvei* che hanno una temperatura di moltiplicazione ottimale superiore ai 35 °C. Tra i microrganismi istaminogeni nessuna specie è al momento classificabile nel gruppo D (Lehane e Olley, 2000; McMeekin *et al.*, 1993).

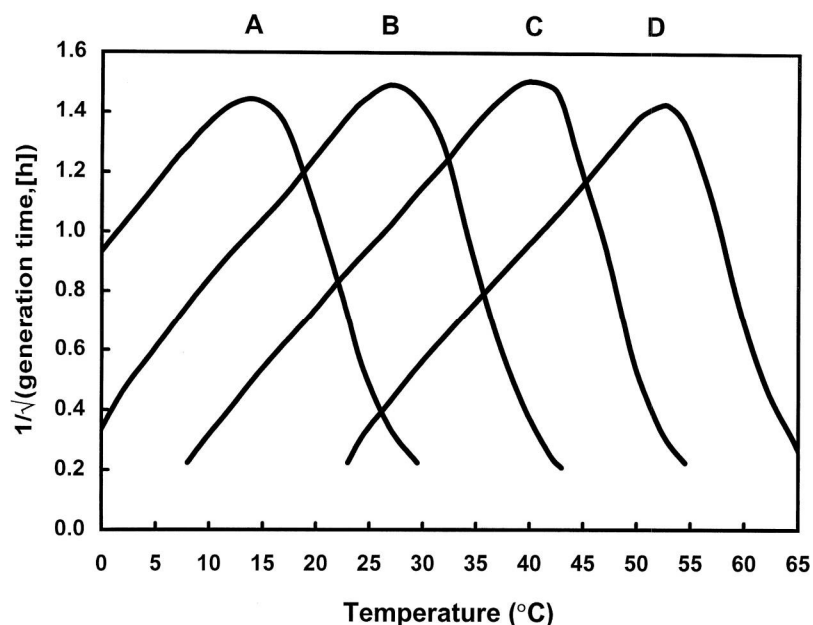


Figura 2.6 Curve di crescita microbica per i batteri appartenenti alle classi termiche A, B, C e D. (Lehane e Olley, 2000; McMeekin *et al.*, 1993)

La maggior parte dei batteri istamino-produttori appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, che comprende bacilli Gram negativi mesofili o termofili, più raramente psicotrofi. Al suo interno sono descritti come forti produttori di istamina le specie: *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella* spp., *Proteus rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Proteus* spp., *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Serratia odorifera*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica*, *Providencia stuartii*, *Pantoea agglomerans* (Ababouch *et al.*, 1991; Frank, 1985; Leitao *et al.*, 1983; Middlebrooks *et al.*, 1988; Tiecco *et al.*, 1984; Yoshinaga e Frank, 1982; Frank e Yoshinaga, 1984; Kim *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008). Qualora si ritrovino enterobatteri nella matrice alimentare quali responsabili della produzione di istamina, la loro presenza è dovuta a bassi tenori igienici nella manipolazione dei prodotti della pesca (Taylor e Speckhard, 1983). A seconda della specie le condizioni che garantiscono un'ottimale produzione di istamina cambiano: per quanto riguarda *Morganella morganii* e *Klebsiella pneumoniae* la produzione di istamina è più elevata a 37 °C. *Klebsiella pneumoniae* decarbossila l'istidina prevalentemente nelle prime 24 ore di sviluppo, mentre *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii* ed *Escherichia coli* producono istamina per 72 ore di incubazione fino a 24 ore dall'inizio del decremento della carica microbica. L'attività di questi microrganismi diminuisce a temperature comprese tra i 7 e i 15 °C e cessa del tutto a 0 °C (Behling e Taylor, 1982). Anche all'interno del genere *Clostridium* sono state indicate come produttrici di istamina le seguenti specie microbiche: *Clostridium perfringens*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium fallax* e *Clostridium novyi*. *Clostridium perfringens*, a differenza degli enterobatteri, si trova normalmente nei sedimenti marini e nel pesce, producendo a 4 °C notevoli quantità di istamina (Taylor e Speckhard, 1983; Tiecco *et al.*, 1984). Diversi studi hanno permesso l'identificazione di ulteriori microrganismi istaminogeni appartenenti alle famiglie *Pseudomonadaceae* e *Vibrionaceae*, ovvero *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens/putida*,

Pseudomonas putrefaciens, *Pseudomonas* spp., *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio* spp. (Ababouch *et al.*, 1991; Frank, 1985; Frank e Yoshinaga, 1984; Middlebrooks *et al.*, 1988; Ryser *et al.*, 1984; Tiecco *et al.*, 1984; Yoshinaga e Frank, 1982). Sono istaminogene anche specie del genere *Aeromonas* (*Aeromonas* spp. e *Aeromonas hydrophila*), del genere *Acinetobacter* (*Acinetobacter* spp. e *Acinetobacter Iwofii*), del genere *Alteromonas* (*Alteromonas putrefaciens*) e dei generi *Achromobacter*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (Middlebrooks *et al.*, 1988; Ienistea, 1973; Frank, 1985; Tiecco *et al.*, 1984). Nel 2006 Emborg e coll. hanno identificato *Morganella psychrotolerans* come un'altra specie forte produttrice di istamina. Anche i fotobatteri facenti parte della flora psicrofila marina hanno dimostrato la capacità di decarbossilare l'istidina: *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* e *Photobacterium phosphoreum* sono riportati tra le principali cause di HFP (Kimura *et al.*, 2000; Kanki *et al.*, 2004). In uno studio di Rivas e coll. (2006) inoltre, anche *Photobacterium iliopiscarium* è stato riconosciuto capace di produrre grandi quantità di istamina alla temperatura di 4 °C.

2.6 TERRENI DI COLTURA PER BATTERI ISTAMINOGENI

Nel gennaio del 1981 C.F. Niven jr. insieme a M.B. Jeffrey e D.A. Corlett jr., pubblicò un articolo sulla rivista *Applied and Environmental Microbiology* in cui propose la formulazione di un nuovo terreno di coltura solido differenziale per l'isolamento e il riconoscimento dei batteri con capacità enzimatiche istidino-decarbossilanti. A tutt'oggi il terreno di Niven è praticamente l'unico terreno di coltura utilizzabile per scoprire se un microrganismo è in grado di produrre istamina. La ricetta originale prevede:

- 0,5% di triptone;
- 0,5 % di estratto di lievito;
- 2,7% di L-istidina · 2HCl;
- 0,5% di NaCl;
- 0,1% di CaCO₃;
- 2% di agar;
- 0,006% di violetto di bromocresolo.

Il pH deve essere portato al valore di 5,3 e il terreno va autoclavato a 120 °C per 7 minuti al fine di evitare l'idrolisi dell'agar, evento probabile a valori di pH acidi. Dopo l'incubazione per un tempo variabile dalle 36 alle 72 ore e alla temperatura di 35° +/- 2 °C, che si è dimostrata la più efficace per favorire la crescita microbica, i microrganismi istaminogeni si presentano sotto forma di colonie viola circondate da un alone dello stesso colore. L'utilizzo del violetto di bromocresolo come indicatore permette di osservare la variazione del pH dovuta all'alcalinità dell'istamina che progressivamente si forma ed accumula. Il terreno infatti, inizialmente acido, vira dal giallo al violetto in proporzione all'aumento del pH (Niven *et al.*, 1981).

Negli anni sono sorti alcuni problemi riguardanti l'utilizzo del terreno di Niven e dubbi sulla sua reale efficacia. I punti di maggior criticità sono:

- l'incertezza sul fatto che il terreno permetta analisi di tipo quantitativo o qualitativo;
- il suo grado di selettività;
- la brevità del tempo di autoclavatura;
- l'interpretazione della differenziazione cromatica (per esempio il dubbio se si essa si riferisca all'alone che circonda le colonie o alle colonie stesse);
- le tempistiche di incubazione più adatte;
- l'optimum di temperatura.

Poiché numerosi studi riportano queste difficoltà nell'utilizzo del terreno, molti ricercatori hanno tentato di modificarlo ma senza risultati soddisfacenti (Ababouch *et al.*, 1991; Baranowski, 1985; Chen *et al.*, 1989; Fletcher *et al.*, 1995; Klausen e Huss, 1987; Lopez-Sabater *et al.*, 1996; Roig-Sagues *et al.*, 1997; Yoshinaga e Frank, 1982).

Chen e collaboratori nel 1989 hanno sperimentato alcune variazioni rispetto al terreno originale, incrementando il pH da 5,3 a 6,5 e aggiungendo glucosio allo 0,05%. La prima scelta è stata giustificata dall'intento di favorire la crescita anche di quei microrganismi che vengono normalmente inibiti da valori acidi di pH. L'aggiunta di glucosio è stata effettuata poiché la sua utilizzazione da parte dei batteri abbassa il pH del terreno, stimolando così la produzione dell'enzima istidina-decarbossilasi. Nel 2000 Brindani e collaboratori hanno testato alcuni stipiti batterici precedentemente isolati, seminandoli sul terreno di Niven

originale e su altre tre sue varianti. La potenzialità istaminogena di questi ceppi è stata successivamente verificata tramite l'utilizzo della metodica HPLC, che ne ha consentito la determinazione quantitativa.

Tabella 2.5 Differente comportamento degli stipiti microbici nel terreno di Niven ed in alcune sue varianti. (Brindani, 2000)

STIPITE	Niven (pH 5,3)	Niven mod. (pH 6,5)	Niven G (pH 5,3)	Niven G mod. (pH 6,5)	Potenzialità istaminogena (ppm)
1	++	++	-	-	373
2	+++*	++	++	+	366
3	++*	++	-	-	158
4	++	+	-	-	191
5	+*	++	-	-	475
6	++	++	-	-	80
7	+*	++	-	-	145
8	+++*	++	++	+++	400
9	++	++	-	++	61
10	+++*	++	-	-	191
11	++	+++	-	-	0
12	++	++	-	-	0
13	++	+	-	-	239
14	+++*	+	++	-	1664
15	+++*	+	++	-	4260
16	++	++	-	++	0
17	+++	++	++	++	0
18	++*	++	++	+	0
19	++*	++	-	-	0
20	++	++	-	+	17

Come evidenziabile dalla tabella, il terreno di Niven nella sua formulazione originale sembrerebbe essere quello che fornisce risultati più concordanti con quelli della metodica HPLC e quindi il più attendibile.

Anche Mavromatis e Quantick (2002) hanno condotto alcuni studi sul terreno di Niven, modificandone diversi parametri e verificandone gli effetti. Una loro importante osservazione è stata il constatare che il terreno subisce modificazioni cromatiche non solo sulla base della presenza di istamina, ma anche a seconda del ceppo microbico che vi è seminato. Ad esempio *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alvei* cambiano il colore del terreno in un viola ben distinguibile, invece *Morganella morganii* lo fa virare al rosso-viola. Questa variabile rende meno oggettiva l'interpretazione dei risultati nella distinzione tra ceppi positivi e ceppi negativi per la produzione di istamina. Gli stessi autori

hanno evidenziato che il viraggio di colore è più deciso ad un valore di pH compreso tra 5,3 e 5,5, ma che questo esita in una selezione dei ceppi resistenti ad ambienti acidi, non permettendo la crescita di altre flore microbiche potenzialmente istaminogene, come ad esempio i batteri anaerobi ed in particolare *Clostridium perfringens* (Taylor e Speckhard, 1983). Aumentando il pH, tuttavia, il viraggio diventa meno evidente sino ad essere del tutto illeggibile a pH 6,3. Altri due parametri considerati nello studio sono stati la temperatura e i tempi di incubazione. Mavromatis e Quantick hanno concluso che l'optimum di crescita per i batteri istaminogeni è ad una temperatura di 30 °C (a differenza dei 35 °C stabiliti da Niven) per un tempo di 48 ore. Infatti, alla temperatura di 37 °C, ottimale per evidenziare il viraggio di colore, si rischia la crescita troppo veloce di alcuni ceppi istaminogeni che, facendo virare in breve tempo il terreno, mascherano l'eventuale produzione di istamina da parte di ceppi che a quella temperatura hanno una crescita più lenta.

Secondo altri ricercatori un ulteriore problema consiste nel fatto che il terreno si comporta in maniera differente a seconda che si utilizzino ceppi puri o colonie miste. In questa seconda eventualità la differenziazione delle colonie non è agevole (Yamani e Untermann, 1985). Numerosi studi indicano che il terreno di Niven, sebbene di indubbia utilità, presenta alcune problematiche legate alla frequente presenza di risultati falsi positivi e falsi negativi. Ciò è dovuto al fatto che la distinzione tra la positività e la negatività è basata sul viraggio di colore causato da una reazione alcalina e non sul rilevamento specifico della formazione di istamina. La produzione di ammoniaca da parte dei batteri ad esempio, può esitare in false positività. Al contrario le false negatività si ritrovano in concomitanza con un'eccessiva produzione di sostanze acide che neutralizzano l'aumento di pH dovuto all'accumulo di istamina (Actis *et al.*, 1999; Jorgensen *et al.*, 2000; Ababouch *et al.*, 1989; Ababouch *et al.*, 1991; Baranowski, 1985; Taylor e Speckhard, 1983).

Nella ricerca di un metodo diagnostico più veloce per l'identificazione delle flore istaminogene Tao e colleghi nel 2009 hanno proposto un nuovo terreno di coltura differenziale per l'individuazione dei questi microrganismi nell'acqua di mare e nei prodotti della pesca. Aliquote di 1 ml di acqua marina sono state filtrate attraverso una membrana a doppio foglietto avente i pori delle dimensioni di 10 µm. La membrana di ciascun campione è stata poi sciacquata

con 10 ml di soluzione fisiologica sterile e il filtro più interno posizionato su piastre Petri sulla superficie del nuovo substrato chiamato *Seawater Agar Medium*. Per le analisi dei prodotti della pesca 1 g di pelle di pesce per ciascun campione è stato posto in 9 ml di soluzione fisiologica. Una volta eseguite le opportune diluizioni, esse sono state filtrate attraverso una membrana a doppio foglietto che è stata poi sciacquata con 10 ml di soluzione fisiologica sterile. Il filtro più interno della membrana è stato poi posizionato su piastre del terreno sopra citato. Il blu di bromotimolo, usato da questi autori come indicatore, fa virare il substrato di coltura da giallo a blu in concomitanza con un'alcalinizzazione del pH. Sono state quindi considerate come positive per la produzione di istamina le colonie con aloni blu, visivamente identificabili già dopo 24 ore dall'inizio dell'incubazione a 35 °C.

Capitolo 3

Parte sperimentale

3.1 MATERIALI E METODI

Sinora il substrato di coltura più utilizzato per l'isolamento dei batteri istamino-produttori rimane il terreno di Niven, sebbene permanessero diversi dubbi sulle sue sensibilità e specificità. Allo scopo di migliorare la tecnica analitica di identificazione delle flore istaminogene nel 2009 Tao e colleghi hanno elaborato la formulazione di un nuovo terreno differenziale denominato Seawater Agar Medium. A tutt'oggi non vi sono studi comparativi tra le due metodiche, perciò l'obiettivo iniziale della tesi è stato quello di confrontare l'efficacia di questi due differenti substrati di coltura nell'analisi di prodotti della pesca regolarmente commercializzati. Nel corso della ricerca inoltre, sono state effettuate delle modifiche al Seawater Agar Medium con l'obiettivo di adattarlo alla tipologia di campionamento adottata e conseguentemente di migliorarne l'efficienza nell'identificazione dei microrganismi istamino-produttori.

3.1.1 MATERIALI USATI:

Si sono considerati come campioni oggetto delle mie analisi 494 esemplari delle specie ittiche di seguito riportate nelle tabelle:

Tabella 3.1 Specie ittiche analizzate e rispettive quantità di campioni.

Sgombro (<i>Scomber scombrus</i>)	122
Sardina (<i>Sardina pilchardus</i>)	166
Alice (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	40
Tonno (<i>Thunnus alalunga</i>)	41

Tabella 3.2 Specie ittiche analizzate e rispettive quantità di campioni.

Orata (<i>Sparus aurata</i>)	50
Branzino (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	25
Cefalo (<i>Mugil cephalus</i>)	30
Merluzzo (<i>Gadus morhua</i>)	20



Figura 3.1 Sgombro (*Scomber Scombrus*).



Figura 3.2 Sardina (*Sardina pilchardus*).



Figura 3.3 Alice (*Engraulis encrasicolus*).



Figura 3.4 Tonno (*Thunnus alalunga*).



Figura 3.5 Orata (*Sparus aurata*).



Figura 3.6 Branzino (*Dicentrarchus labrax*).



Figura 3.7 Cefalo (*Mugil cephalus*).



Figura 3.8 Merluzzo (*Gadus morhua*).

Per il campionamento sono stati impiegati:

- sacchetti sterili tipo Stomaker;
- contenitore frigorifero portatile;
- termometro Mettler.

Il materiale necessario alla composizione dei terreni utilizzati è stato il seguente:

- bilancia analitica e chimica;
- triptone (Oxoid);
- peptone universale (Oxoid);
- estratto di lievito (Oxoid);
- L-istidina x 2HCl (Sigma Aldrich);
- NaCl (Oxoid);
- CaCO₃ (Sigma Aldrich);
- agar-agar (Oxoid);
- violetto di bromocresolo (Sigma Aldrich);
- blu di bromotimolo (Labochimica);
- glucosio (Sigma Aldrich);
- solfato di magnesio (MgSO₄ x 7H₂O) (Sigma Aldrich);
- cloruro di magnesio (MgCl₂ x 6H₂O) (Sigma Aldrich);
- cloruro di calcio (CaCl₂ x 2H₂O) (Sigma Aldrich);
- cloruro di potassio (KCl) (Sigma Aldrich);
- bromuro di sodio (NaBr) (Sigma Aldrich);
- cloruro di stronzio (SrCl₂ x 6H₂O) (Sigma Aldrich);
- acido borico (H₃BO₃) (Sigma Aldrich);

- fluoruro di sodio (NaF) (Sigma Aldrich);
- ioduro di potassio (KI) (Sigma Aldrich);
- piastra scaldante;
- ancoretta magnetica;
- navicella monouso;
- spatola;
- bottiglia tarata in pyrex;
- acido cloridrico;
- pHmetro;
- autoclave;
- piastre Petri.

Il materiale strumentario adoperato per l'esecuzione delle analisi viene di seguito riportato:

- becco Bunsen;
- bilancia analitica;
- stagnola sterile;
- forbici sterili;
- strumenti sterili monouso (pinze e bisturi);
- contenitori sterili per urine;
- anse;
- pipettatrici con puntali sterili;
- spatole;
- termostato alla temperatura di $31 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$;
- terreno di arricchimento Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Oxoid);
- terreno differenziale MacConkey (Oxoid);
- terreno selettivo e differenziale Glutamate Starch Phenol Red Agar (GSP) (Oxoid);
- terreno selettivo e differenziale Baird Parker (BP) (Oxoid);
- terreno differenziale Triple Sugar Iron Agar (TSI agar) (Oxoid);
- Microbank;

- prove biochimiche in micrometodo API Biomérieux;
- test dell'ossidasi;
- test della catalasi;
- colorazione di Gram;
- vetrini;
- microscopio ottico.

3.2 CAMPIONAMENTO

I campioni sono stati prelevati nel arco temporale compreso tra il mese di gennaio dell'anno 2013 e il mese di gennaio dell'anno 2015 presso diversi punti vendita al dettaglio distribuiti nel territorio veneto esteso tra le province di Treviso e Padova.

3.2.1 MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO

Gli esemplari di pesce campionati sono stati regolarmente acquistati da rivenditori al dettaglio, da cui erano stati mantenuti su banco di vendita alla temperatura del ghiaccio fondente come previsto dalla legge. Al momento dell'acquisto i pesci sono stati confezionati singolarmente in appositi sacchetti sterili e posizionati all'interno di un contenitore refrigerato alla temperatura di circa 4 - 6 °C, rilevata per mezzo di termometro a contatto Metler. Giunti in laboratorio ai campioni è stata verificata nuovamente la temperatura, che si aggirava attorno ai 5 - 7 °C. In seguito dopo essere stati identificati, codificati ed elencati nel registro di laboratorio, i campioni sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione all'interno di un apposito frigorifero loro destinato. Successivamente e sequenzialmente ogni campione ha subito un processo analitico sulla base di puntuali ed attenti passaggi svolti assicurando la asepsi. Nel dettaglio, ogni campione è stato posizionato su fogli di carta stagnola precedentemente sterilizzata in autoclave. È stata così aperta la cavità celomatica di ogni esemplare adoperando strumenti sterili monouso per poter

accedere comodamente al tratto del segmento intestinale di nostro interesse, ovvero quello compreso tra i ciechi pilorici e l'ano. Il campione è stato prelevato tramite clampaggio delle estremità ablate per impedire che il contenuto del segmento fuoriuscisse. La porzione di intestino è stata quindi immersa in brodo di arricchimento BHI (Brain Heart Infusion Oxoid), in proporzione 1 a 10 a seconda del suo peso. La stessa operazione di arricchimento in brodo è stata svolta nei confronti della porzione muscolare, prelevata ad esclusione del tegumento, in prossimità dell'opercolo branchiale e occupante porzione della cavità celomatica dell'esemplare stesso. I due campioni prelevati da ogni esemplare, rispettivamente intestino e muscolo, sono stati incubati in contenitori sterili a temperatura costante di $31^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ per 24 ore. Una volta ottenuto l'intorbidimento del brodo, indice di proliferazione microbica, esso è stato seminato per mezzo di anse sterili in due terreni solidi differenziali e selettivi, ovvero BP e GSP e contemporaneamente su un altro terreno differenziale MACC; la semina ha interessato tutta la superficie disponibile della piastra Petri. Da qui le tre piastre seminate sono state messe ad incubare alle seguenti temperature: MACC e BP a 37°C per 24 ore, GSP a 20°C per 48 ore. Attesi i necessari tempi per la crescita delle rispettive flore microbiche, si sono potute apprezzare sulla loro superficie le diverse tipologie di colonie cresciute. Conseguentemente i diversi tipi di colonie sono stati trasferiti e seminati singolarmente in terreni omologhi applicando la tecnica della triplice ansata. Le colonie così ottenute in purezza, sono risultate idonee per essere seminate sulla superficie del terreno di Niven (nella versione proposta da Mavromatis e Quantick con il 3% di agar) e del Seawater Agar Medium modificato. In parallelo le stesse colonie prelevate in purezza venivano crioconservate attraverso appositi *vials* (Microbank) e mantenute alla temperatura di -80°C per eventuali successive indagini. Entrambi i substrati di coltura utilizzati per le analisi non sono commercializzati come formulazioni già pronte ed è quindi necessario prepararli ogniqualvolta si debbano effettuare delle analisi.

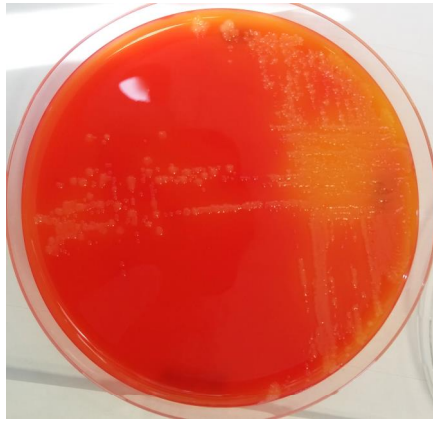


Figura 3.9 Gelatin Phosphate Salt Agar (GSP agar).

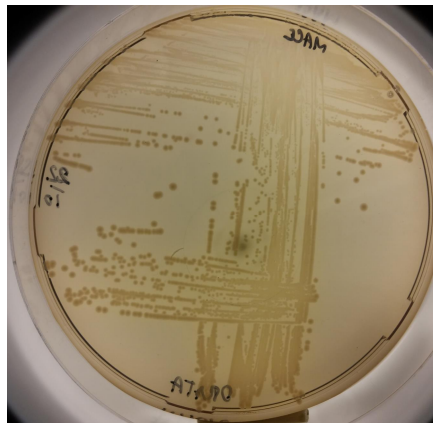


Figura 3.10 MacConkey Agar (MACC agar).



Figura 3.11 Baird Parker Agar (www.eolabs.com)

3.3 TERRENO DI NIVEN

Tabella 3.3 Formulazione del terreno di Niven.

Peptone	5 g
Estratto di lievito	5 g
NaCl	5 g
CaCO ₃	1 g
Istidina	27 g
Agar-agar	30 g
Violetto di bromocresolo	0,06 g
Acqua deionizzata	1000 ml

Il substrato deve essere autoclavato a 120 °C per 7 minuti dopo aver portato il pH al valore di 5,3.

3.4 SEAWATER AGAR MEDIUM

Tabella 3.4 Formulazione del Seawater Agar Medium.

Peptone	10 g
Estratto di lievito	10 g
L-istidina	10 g
Glucosio	2 g
Agar	30 g
Blu di bromotimolo	0,8 g
Acqua marina artificiale	1000 ml

ACQUA MARINA ARTIFICIALE

Tabella 3.5 Formulazione dell'acqua marina artificiale.

Acqua deionizzata	1000 ml
NaCl	28,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	6,82 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,16 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,46 g
KCl	0,726 g
NaBr	0,084 g
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024 g
H ₃ BO ₃	27,2 mg
NaF	2,86 mg
KI	0,078 mg

Il substrato deve essere autoclavato a 121 °C per 15 minuti dopo aver portato il pH al valore di 5,8.

3.5 SEAWATER AGAR MEDIUM MODIFICATO

Tabella 3.6 Formulazione del Seawater Agar Medium modificato.

Peptone	10 g
Estratto di lievito	10 g
L-istidina	10 g
Glucosio	2 g
Agar	40 g
Blu di bromotimolo	0,8 g
Acqua marina artificiale	1000 ml

ACQUA MARINA ARTIFICIALE MODIFICATA

Tabella 3.7 Formulazione dell'acqua marina artificiale modificata.

Acqua deionizzata	1000 ml
NaCl	14,25 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	6,82 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,16 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,46 g
KCl	0,726 g
NaBr	0,084 g
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024 g
H ₃ BO ₃	27,2 mg
NaF	2,86 mg
KI	0,078 mg

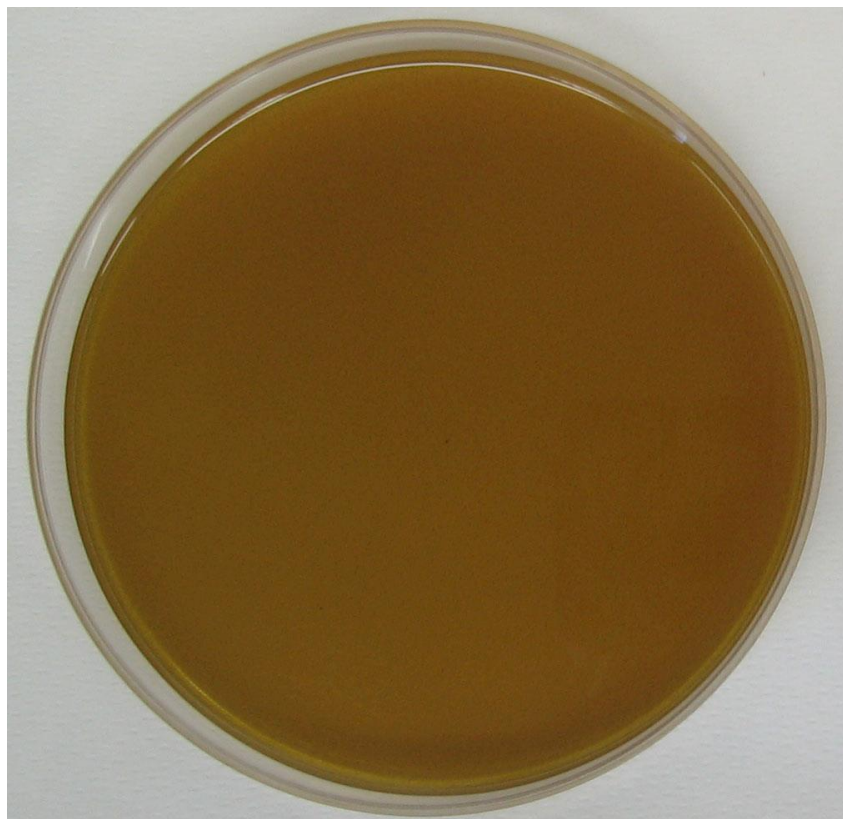


Figura 3.12 Seawater Agar Medium modificato.

In una bottiglia tarata di capacità superiore a 1 l sono stati versati circa 400 ml di acqua distillata e demineralizzata per mezzo di un cilindro tarato. All'interno della stessa è stata inserita un'ancoretta magnetica. La bottiglia è stata successivamente posta su piastra scaldante. Nel frattempo sono stati pesati su bilancia analitica, utilizzando navicelle monouso e spatola, i singoli composti costituenti l'acqua marina artificiale. Gli stessi in seguito ad uno ad uno venivano versati all'interno della bottiglia posta su piastra scaldante. Dopo lo scioglimento e l'omogeneizzazione della miscela, si è proceduto alla misurazione e all'aggiunta di peptone, L-istidina, estratto di lievito, glucosio e 600 ml di acqua distillata e demineralizzata per portare a volume la soluzione. Il blu di bromotimolo, utilizzato come indicatore di pH, è stato pesato su bilancia analitica posta all'interno di una cappa chimica. Dopo aver addizionato il colorante si è verificato il valore del pH della miscela tramite l'uso di un pHmetro. Utilizzando la modalità di misurazione continua il terreno è stato acidificato progressivamente tramite l'impiego di acido cloridrico sino al raggiungimento del valore stabilito nella ricetta originale (5,8). La bottiglia è stata poi riposizionata su piastra scaldante per completare la formulazione con l'aggiunta dei 40 g di agar. La miscela è stata portata al punto di ebollizione e successivamente posta in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Una volta terminato il processo di sterilizzazione il Seawater Agar Medium modificato è stato distribuito in quantità di circa 15-16 ml per ciascuna piastra Petri e, una volta solidificato, conservato in confezioni sterili a temperatura di refrigerazione. Durante l'utilizzo del terreno è stato notato inoltre che esso alla temperatura di 4 +/- 2 °C possiede una durabilità che non supera le due settimane a partire dal giorno della preparazione. Dopo due settimane infatti iniziano ad essere visibili delle fessurazioni nel substrato di coltura.

Partendo dalla ricetta originaria di Tao e collaboratori (2008), il terreno Seawater Agar Medium ha subito una serie di modifiche allo scopo di renderlo più efficace e funzionale alla tipologia di campionamento adottata. In virtù di questo fatto, a partire dal mese di gennaio dell'anno 2013, la composizione del terreno oggetto di questa parte di studio, ha subito diverse fasi di aggiustamento:

Tabella 3.8 Elenco in ordine temporale delle modifiche apportate al Seawater Agar Medium originale.

	Agar	Colorante	pH	NaCl	aW	giudizio
Ricetta 1	60 g	Violetto di bromocresolo	5,8	28,50 g		-----
Ricetta 2	50 g	Rosso di bromofenolo	5,8	28,50 g		-----
Ricetta 3	50 g	Violetto di bromocresolo	5,8	24,00 g		++----
Ricetta 4	44 g	Blu di bromotimolo	5,8	20,00 g		++++--
Ricetta 5	40 g	Sol. alc. 0,4% blu di bromotimolo	5,8	14,25 g	0,980	-----
Ricetta 6	40 g	Blu di bromotimolo	5,8	14,25 g	0,980	+++++

Nel seguire fedelmente la formulazione descritta dagli autori sopra citati sono state riscontrate alcune difficoltà principalmente dovute alla differenza nelle metodiche utilizzate per le analisi. Per verificare di volta in volta l'efficacia delle variazioni apportate, sono stati testati sul Seawater Agar Medium modificato i ceppi che avevano precedentemente mostrato positività per la formazione di istamina sul terreno di Niven. Innanzitutto è stato necessario modificare la quantità di agar del substrato (30 g per 1000 ml), che in origine si presentava in forma semi-solido. I primi tentativi sono stati effettuati con un quantitativo eccessivo di agar, che esitava nella formazione di crepe nel terreno una volta che questo veniva seminato e posto ad incubare. Di conseguenza in ogni prova sono stati miscelati meno grammi di agar rispetto al tentativo precedente, fino a quando si è arrivati ad una quantità (40 g per 1000 ml) che consentisse la semina dei campioni in triplice ansata e non desse problemi di consistenza troppo bassa o troppo elevata. In contemporanea sono stati testati diversi coloranti come indicatori di pH, scegliendo infine il blu di bromotimolo, come da ricetta originale, per la evidenza con cui si manifesta il cambiamento di colore, a sua volta dovuto all'alcalinizzazione del substrato. Un'altra difficoltà si è presentata a causa della percentuale elevata di NaCl (quasi il 3%) nel terreno originale, che consente la crescita solamente di alcuni ceppi batterici. La

riduzione progressiva della concentrazione di NaCl fino al suo dimezzamento ha quindi permesso la crescita anche delle specie alotolleranti, che costituiscono la maggioranza degli stipiti microbici considerati istaminogeni. Nella procedura di aggiustamento del pH è stato *in primis* utilizzato l'acido acetico, che si è rivelato poco efficace nell'acidificazione del terreno essendo un acido debole, *in secundis* l'acido cloridrico, che in piccole quantità ha consentito un rapido abbassamento del pH fino al valore di 5,8. Sia il terreno di Niven che il Seawater Agar Medium modificato identificano la positività per la produzione di istamina sulla base di un cambiamento cromatico del substrato. Questa variazione è dovuta all'impiego rispettivamente del violetto di bromocresolo e del blu di bromotimolo che, essendo indicatori, virano il proprio colore in presenza di una reazione alcalina. Entrambi i terreni, in partenza acidi, alcalinizzano in presenza di istamina, che è una amina basica. Il violetto di bromocresolo a pH acidi si presenta giallo e diviene viola con l'aumento della basicità, mentre il blu di bromotimolo a pH acidi si presenta giallo e diviene blu con l'aumento della basicità. Per verificare che la reazione alcalina fosse dovuta esclusivamente all'accumulo di istamina e non ad altre possibili reazioni (come ad esempio la produzione di ammoniaca) i ceppi batterici risultati positivi su entrambi i substrati sono stati testati su un terreno ottenuto da un'ulteriore modifica del Seawater Agar Medium. Si è pertanto proceduto a sottrarre da quest'ultimo l'istidina, variando di conseguenza le percentuali degli altri componenti. Si è osservato che nelle provette contenenti il terreno così modificato e disposto a becco di clarino, i ceppi sopra citati che vi sono stati seminati non hanno determinato il viraggio di colore. Ciò conferma il fatto che esso era causato prevalentemente dalla trasformazione dell'istidina in istamina. La composizione di quest'ultimo terreno di coltura è riportata nella tabella seguente.

Per 500 ml di acqua distillata:

Tabella 3.9 Formulazione del Seawater Agar Medium con modifiche quantitative dei costituenti e sottrazione di istidina.

Agar	15 g
Glucosio	2 g
Peptone universale	10 g
NaCl	7,125 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	3,41 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	2,58 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,73 g
KCl	0,363 g
NaBr	0,042 g
SrCl ₂ x 6H ₂ O	0,012 g
H ₃ BO ₃	13,6 mg
NaF	1,43 mg
KI	0,039 mg

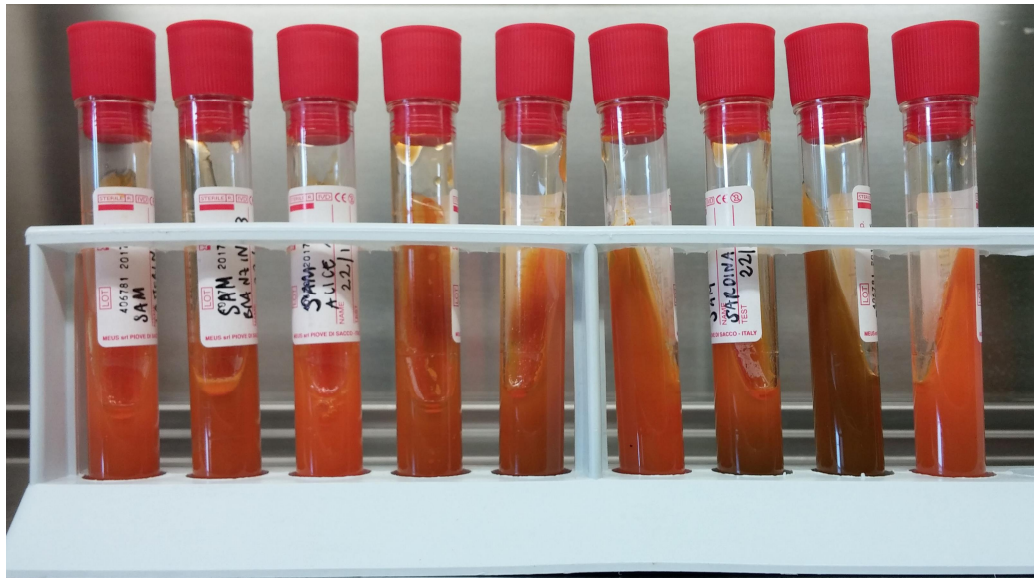


Figura 3.13 Seawater Agar Medium con modifiche quantitative dei costituenti e sottrazione di istidina, in provette a becco di clarino e seminato con ceppi microbici risultati positivi sia sul terreno di Niven che sul Seawater Agar Medium.

Ciascuna colonia isolata in purezza dai terreni MACC, GSP e BP è stata seminata utilizzando la tecnica della triplice ansata sia su una piastra Petri contenente il terreno di Niven che su una piastra Petri contenente il Seawater Agar Medium modificato. Successivamente le due piastre seminate con la medesima colonia sono state poste ad incubare in termostato a 31 +/- 2 °C. La lettura delle piastre è stata effettuata a 24, 48 e 72 ore dalla semina. Per quanto riguarda il terreno di Niven sono state considerate positive per la produzione di istamina solamente le colonie viola con aloni dello stesso colore, mentre per il Seawater Agar Medium modificato le colonie di colore blu-verde con aloni dello stesso colore. I ceppi microbici che hanno dimostrato positività sono poi stati testati nuovamente su entrambi i substrati di coltura. Questa operazione è stata ripetuta ogniqualvolta si conducevano le analisi successive, a suffragio dei risultati già ottenuti. Ad ulteriore conferma della positività rilevata gli stessi ceppi microbici cresciuti sul terreno di Niven sono stati cimentati sul Seawater Agar Medium e viceversa, dimostrando nuovamente le loro caratteristiche istaminogene. A seguito di queste conferme gli stipti batterici in questione sono stati conservati sia in provette a becco di clarino contenenti TSI agar (Triple Sugar Iron Agar Oxoid) e mantenute a temperatura di refrigerazione, sia nelle Microbank alla temperatura di -80 °C. In un secondo momento gli stessi ceppi sono stati sottoposti ad ulteriori test analitici. Per ogni stipte microbico isolato e risultato positivo alla produzione di istamina è stata infatti eseguita la colorazione di Gram, la prova dell'ossidasi, la prova della catalasi ed infine le prove biochimiche in micrometodo API (Biomérieux) per identificarne la specie di appartenenza.

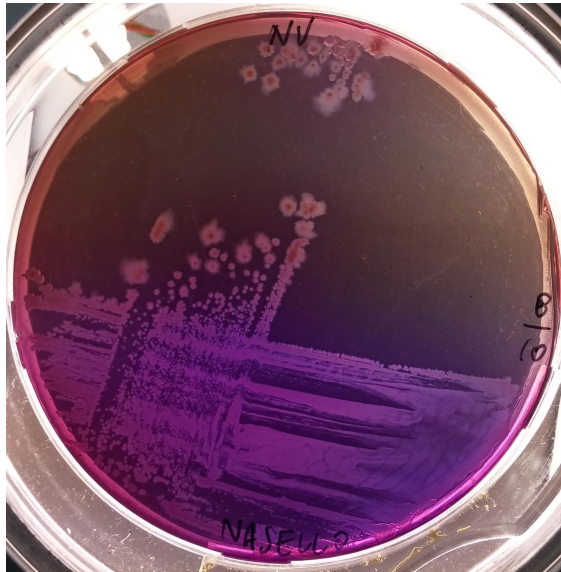


Figura 3.14 Terreno di Niven sul quale sono visibili colonie viola circondate da aloni anch'esso viola.

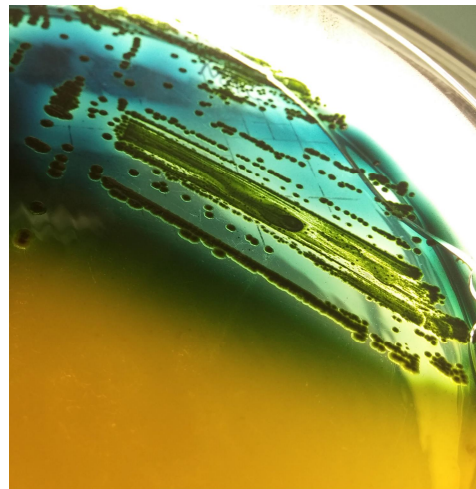
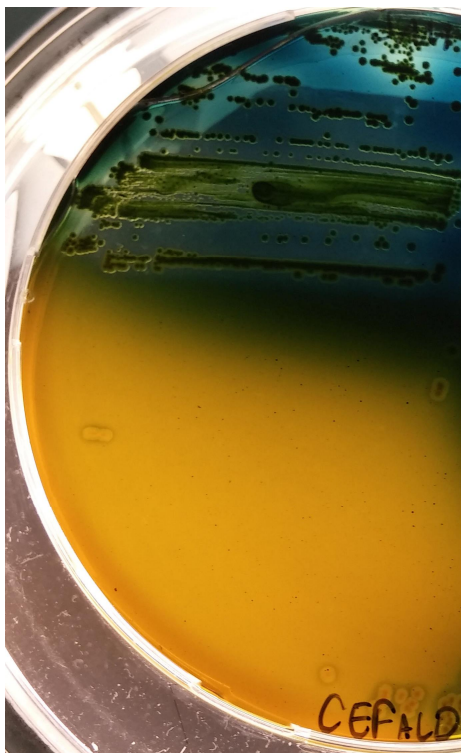


Figura 3.15 e Figura 3.16 Seawater Agar Medium modificato sul quale sono evidenti colonie blu-verdi circondate da un alone dello stesso colore.



Figura 3.17 Test biochimico in micrometodo API 20 E (Biomerieux).

3.6 RISULTATI

Tabella 3.10 Prevalenza delle flora istaminogena isolata nelle due differenti sedi di prelievo.

	Sede anatomica	BP	MACC	GSP
SGOMBRO	muscolo	10%	20%	10%
	intestino	5%	40%	15%
SARDINA	muscolo	5%	30%	10%
	intestino	5%	40%	10%
ALICE	muscolo	10%	25%	10%
	intestino	5%	40%	10%
TONNO	muscolo	35%	30%	35%
	intestino	NP	NP	NP
ORATA	muscolo	0%	5%	5%
	intestino	15%	60%	15%
BRANZINO	muscolo	2,5%	5%	2,5%
	intestino	15%	55%	20%
CEFALO	muscolo	5%	5%	5%
	intestino	10%	55%	20%
MERLUZZO	muscolo	5%	20%	10%
	intestino	15%	35%	15%

A seguito dei risultati ottenuti e riportati in tabella 3.10, che identifica la prevalenza della flora istaminogena nei prodotti della pesca, in particolare in intestino e muscolo, si può asserire che la maggior parte di essa è presente in percentuali maggiori all'interno del lume intestinale e al contrario è scarsamente presente nelle masse muscolari adiacenti alla cavità celomatica. In alcune specie, come ad esempio i clupeiformi (alice e sardina), vi è una maggior presenza nelle masse muscolari di ceppi microbici istaminogeni, probabilmente a causa della precoce degradazione di questi prodotti della pesca rispetto a quelli di altre specie. Alla flora istaminogena isolata a partire da queste matrici ed identificata tramite test biochimici in micrometodo API (Biomerieux) appartengono le seguenti specie microbiche: *Citrobacter youngae*, *Enterobacter amnigenus* tipo 2, *Enterobacter amnigenus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter braakii* tipo 1, *Staphylococcus xylosum*, *Escherichia vulneris*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* biograppo 1, *Averyella dalhousiensis*, *Serratia marcescens* biograppo 1 e *Serratia marcescens*.

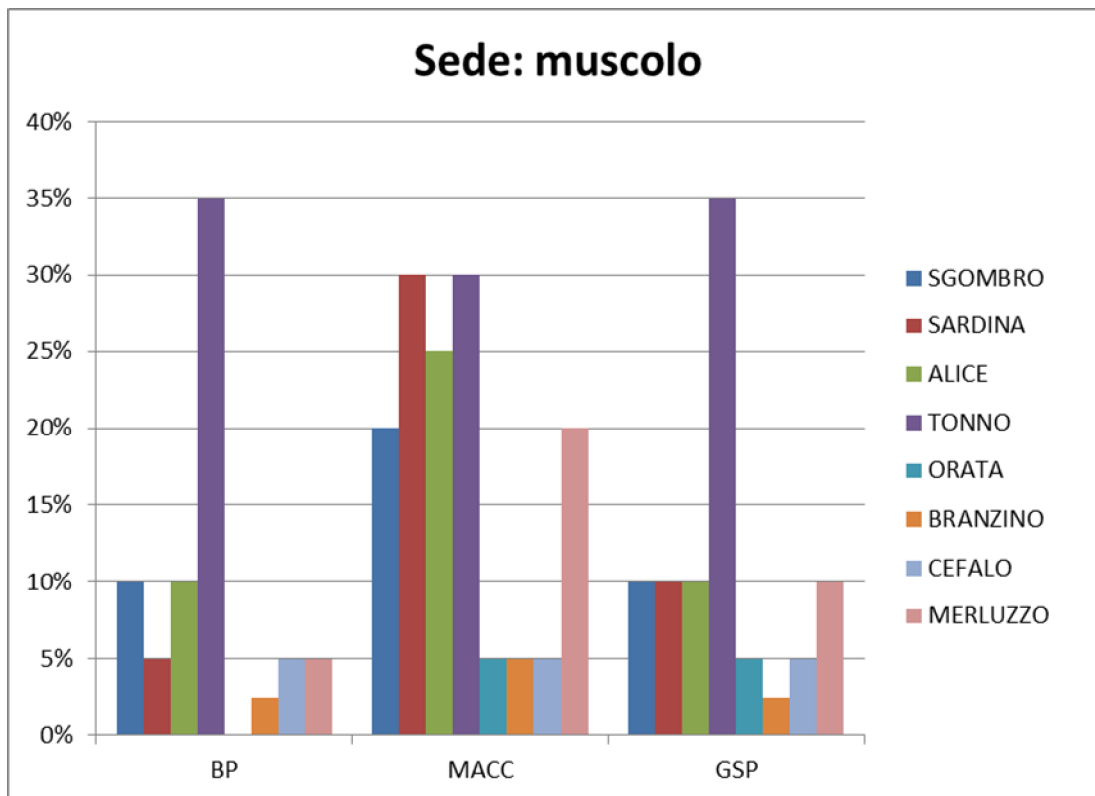


Figura 3.18

La figura 3.18, che contiene la rappresentazione grafica della tabella 3.10, permette di visualizzare le percentuali dei microrganismi istaminogeni ritrovate nella sede di prelievo muscolare a seconda delle differenti specie ittiche. Queste percentuali sono ulteriormente divise a seconda dei terreni di coltura che hanno consentito o inibito la crescita delle colonie batteriche. I prodotti della pesca in cui sono state ritrovate le quantità maggiori di microrganismi istamino-produttori a livello muscolare sono rappresentati da: tonno, sardina, alice e sgombro. Per queste specie i risultati numericamente più rilevanti sono derivati dalle colture sul terreno differenziale MacConkey (MACC), sul quale crescono i batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Questi dati confermano che per alcune specie ittiche il processo di degradazione è più veloce rispetto ad altre e che a seguito di questo si assiste ad una rapida migrazione dei microrganismi dai visceri alle masse muscolari.

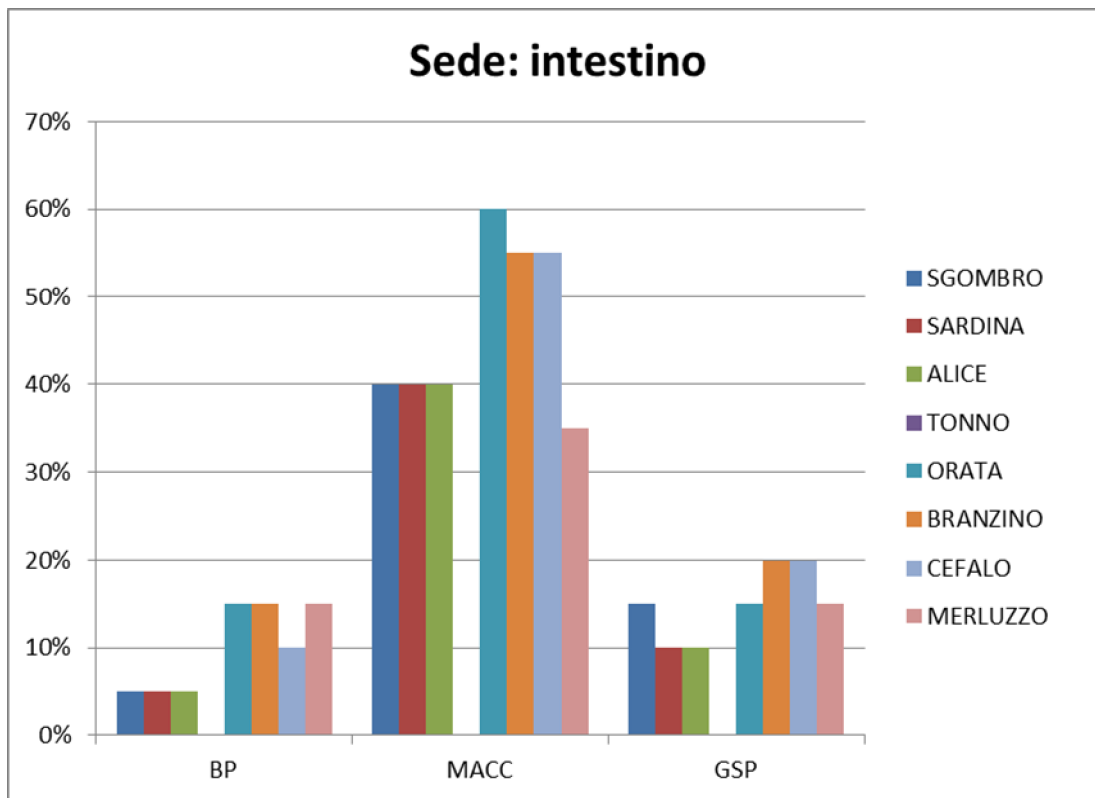


Figura 3.19

Un'elevata percentuale dei microrganismi che hanno dato positività per la produzione di istamina sono derivati dai campioni delle porzioni intestinali (figura 3.19). Per tutte le specie ittiche la maggior parte di questi batteri è stata isolata sul terreno differenziale MacConkey ed è quindi appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Tabella 3.11

TOTALE CAMPIONI= 494	N° campioni	%
SAM più veloce di 24 ore rispetto a NV	173	35,02
SAM + NV -	92	18,62
SAM + NV +	178	30,03
NO crescita in entrambi	10	2,02
Crescita su NV e SAM con viraggio negativo	41	8,30
SAM . NV +	0	0

Legenda: NV= terreno di Niven; SAM= Seawater Agar Medium modificato.

La tabella precedente riassume i criteri secondo i quali sono state valutate le *performances* di entrambi i substrati di coltura nel favorire la crescita microbica e manifestare il viraggio di colore dovuto alla reazione alcalina di trasformazione dell'istidina in istamina. Nel 35,02% dei campioni il *Seawater Agar Medium* modificato si è dimostrato più veloce di 24 ore rispetto al terreno di Niven nel rendere evidente il viraggio di colore. Il 18,62% dei campioni ha dato positività sul *Seawater Agar Medium* modificato e negatività sul terreno di Niven; viceversa nessun campione è risultato positivo sul terreno di Niven e negativo sul *Seawater Agar Medium* modificato. Per il 30,03% delle matrici seminate il viraggio di colore è avvenuto su tutti e due i substrati. Non si è verificata alcuna crescita microbica in entrambi i terreni nel 2,02% dei prodotti della pesca analizzati, mentre nel 8,30% si è potuta osservare una proliferazione microbica sia sul terreno di Niven che sul *Seawater Agar Medium* modificato, che tuttavia non hanno presentato viraggio cromatico. La percentuale calcolata per il numero di campioni in cui il *Seawater Agar Medium* modificato si è dimostrato più veloce nell'evidenziazione del viraggio di colore rispetto al terreno di Niven risulta pari a 35%, a cui corrisponde una significatività rispetto al valore 0 di $P < 0.001$ (test statistico z di confronto tra percentuali); l'intervallo di confidenza per la percentuale calcolata (95%CI) è 30,8 . 39,2 (non comprende il valore nullo). Si può affermare quindi che tale percentuale è significativamente diversa da 0 e dunque il *Seawater Agar Medium* modificato è significativamente più veloce rispetto al terreno di Niven.

Se al numero totale di prodotti analizzati (494) si sottraggono il numero degli stessi che non ha esitato in alcuna crescita microbica (10) e il numero di campioni che ha dato viraggio negativo in entrambi i substrati di coltura (41), la frequenza di campioni in cui SAM è più veloce di NV è pari a 39% e tale valore resta significativamente diverso da 0 per $P < 0,001$ (l'intervallo di confidenza al 95% diviene 34,5-43,6). Incrociando i risultati dei due test in una tabella 2x2 otteniamo i seguenti dati:

Tabella 3.12

	SAM viraggio +	SAM viraggio -
NV viraggio +	351	0
NV viraggio -	92	41

Il test statistico chi-quadro di associazione tra i due metodi è risultato pari a 118 con $P < 0,001$, indicando perciò una significativa associazione-coerenza tra gli esiti dei due test. In particolare si è stimato che se un microrganismo risulta positivo su SAM si ha una probabilità che lo sia anche su NV pari a 0.80.

Tabella 3.13

SGOMBRO	N° campioni	%
Totale campioni= 122		
SAM più veloce di 24 ore rispetto a NV	72	59
SAM + NV -	10	8,20
SAM + NV +	40	32,80
NO crescita in entrambi	0	0
Crescita su NV e SAM con viraggio negativo	0	0

Nel caso dello sgombro la percentuale dei campioni per i quali il SAM è risultato più veloce di NV è pari al 59%; tale percentuale è significativamente diversa da 0 (per $P < 0,001$), dunque anche in questo caso SAM è significativamente più

veloce di NV nel rivelare il viraggio di colore. L'intervallo di confidenza calcolato al 95% è pari a 50,3 - 67,7, quindi ci si aspetta che in più del 50% dei casi SAM sia più veloce di NV.

Tabella 3.14

SARDINA	N° campioni	%
Totale campioni= 166		
SAM più veloce di 24 ore rispetto a NV	61	36,75
SAM + NV -	40	24,10
SAM + NV +	55	33,13
NO crescita in entrambi	0	0
Crescita su NV e SAM con viraggio negativo	10	6,02

Coerentemente ai risultati generali, per quanto riguarda la sardina la percentuale di campioni analizzati in cui SAM ha dimostrato una velocità superiore rispetto a NV è circa il 35% (significativamente diverso da 0 per $P < 0.001$).

Tabella 3.15

	SAM viraggio +	SAM viraggio -
NV viraggio +	116	0
NV viraggio -	40	10

Il coefficiente di associazione chi quadro calcolato tra i due metodi è pari a 25 con $P < 0.001$. Si conferma quindi la coerenza tra i due metodi. Il Valore Positivo Predittivo del test è pari a 0.74, dunque a scopo precauzionale possiamo dire che se SAM è positivo lo è anche NV con probabilità superiore al 70%.

Tabella 3.16

ALICE	N° campioni	%
Totale campioni= 40		
SAM più veloce di 24 ore rispetto a NV	0	0
SAM + NV -	22	55
SAM + NV +	18	45
NO crescita in entrambi	0	0
Crescita su NV e SAM con viraggio negativo	0	0

Per quanto riguarda le alici non si osserva una maggiore e significativa velocità di un metodo rispetto all'altro.

Tabella 3.17

TONNO	N° campioni	%
Totale campioni= 41		
SAM più veloce di 24 ore rispetto a NV	20	48,78
SAM + NV -	0	0
SAM + NV +	15	36,58
NO crescita in entrambi	0	0
Crescita su NV e SAM con viraggio negativo	6	14,63

Nei campioni di tonno osserviamo che la percentuale di prodotti analizzati in cui SAM è più veloce di NV ha lo stesso ordine di grandezza di quello rilevato per gli sgombri (circa il 50%). La percentuale (48,78%) è significativamente diversa da 0 per $P < 0.001$. Incrociando i dati ottenuti utilizzando i due substrati si osserva come ci sia una perfetta concordanza di risultati (chi quadro= 41, $P < 0.001$).

Tabella 3.18

	SAM viraggio +	SAM viraggio -
NV viraggio +	35	0
NV viraggio -	0	6

Tabella 3.19

ORATA	N° campioni	%
Totale campioni= 50		
SAM più veloce di 24 ore rispetto a NV	10	20
SAM + NV -	0	0
SAM + NV +	20	40
NO crescita in entrambi	10	20
Crescita su NV e SAM con viraggio negativo	10	20

La percentuale di campioni in cui SAM è risultato più veloce è pari a 20 (significativamente diversa da 0 per $P < 0.001$), un valore leggermente inferiore rispetto a quelli visti ottenuti per le altre specie ittiche.

Tabella 3.20

	SAM viraggio +	SAM viraggio -
NV viraggio +	20	0
NV viraggio -	0	10

Il coefficiente di concordanza è risultato pari a 30 con $P < 0.001$.

Tabella 3.21

BRANZINO	N° campioni	%
Totale campioni= 25		
SAM più veloce di 24 ore rispetto a NV	10	40
SAM + NV -	0	0
SAM + NV +	10	40
NO crescita in entrambi	0	0
Crescita su NV e SAM con viraggio negativo	5	20

La percentuale di campioni per i quali SAM è stato più veloce nella evidenziazione del viraggio di colore (40%) è significativamente diversa da 0 per $P < 0.001$.

Tabella 3.22

	SAM viraggio +	SAM viraggio -
NV viraggio +	20	0
NV viraggio -	0	5

Il test di associazione tra i due metodi analitici per la specie Branzino è pari a 25 con $P < 0.001$.

Tabella 3.23

CEFALO	N° campioni	%
Totale campioni= 30		
SAM più veloce di 24 ore rispetto a NV	0	0
SAM + NV -	20	66,66
SAM + NV +	0	0
NO crescita in entrambi	0	0
Crescita su NV e SAM con viraggio negativo	10	33,33

Tabella 3.24

MERLUZZO	N° campioni	%
Totale campioni= 20		
SAM più veloce di 24 ore rispetto a NV	0	0
SAM + NV -	0	0
SAM + NV +	20	100
NO crescita in entrambi	0	0
Crescita su NV e SAM con viraggio negativo	0	0

Tabella 3.25

92 campioni che hanno dato positività (viraggio di colore) sul Seawater Agar Medium modificato (SAM) e negatività sul terreno di Niven. Le %⁺ rappresentano la quantificazione della crescita microbica: x = scarsa, xx = discreta, xxx = buona, xxxx = elevata.

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
1. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
2. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
3. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
4. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
5. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
6. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
7. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
8. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
9. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
10. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
11. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
12. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
13. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
14. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
15. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
16. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
17. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
18. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
19. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
20. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
41. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
42. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
43. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
44. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
45. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
46. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
47. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
48. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
49. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
50. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
51. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
52. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
53. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
54. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
55. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
56. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
57. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
58. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
59. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
60. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
61. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
62. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
63. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
64. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
65. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
66. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
67. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
68. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
69. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
70. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
71. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
72. alice	24 h	xx	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	no	no
73. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
74. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
75. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
76. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
77. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
78. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
79. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
80. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
81. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
82. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
83. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
84. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
85. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
86. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
87. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
88. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
89. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
90. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
91. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no
92. cefalo	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	no	no
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	no	no

Tabella 3.26

173 campioni che hanno dato positività (viraggio di colore) sul Seawater Agar Medium modificato (SAM) più velocemente (24 ore) rispetto al terreno di Niven. Le %+ rappresentano la quantificazione della crescita microbica: x = scarsa, xx = discreta, xxx = buona, xxxx = elevata.

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
1. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
2. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
3. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
4. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
5. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
6. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
7. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
8. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
9. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
10. sgombro	24 h	xxx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
11. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	si	viola
12. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	si	viola
13. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	si	viola
14. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	si	viola
15. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	si	viola
16. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	si	viola
17. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	si	viola
18. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	si	viola
19. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	si	viola
20. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxx	si	viola

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
61. sgombro	24 h	x	si	blu-verde	xxxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
62. sgombro	24 h	x	si	blu-verde	xxxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
63. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	rosso-viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	rosso-viola
64. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	rosso-viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	rosso-viola
65. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	rosso-viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	rosso-viola
66. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	rosso-viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	rosso-viola
67. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	rosso-viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	rosso-viola
68. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	rosso-viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	rosso-viola
69. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	rosso-viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	rosso-viola
70. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	rosso-viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	rosso-viola

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
71. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	rosso-viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	rosso-viola
72. sgombro	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	rosso-viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	rosso-viola
73. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	x	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xx	si	viola
74. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	x	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xx	si	viola
75. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	x	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xx	si	viola
76. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	x	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xx	si	viola
77. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	x	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xx	si	viola
78. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	x	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xx	si	viola
79. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	x	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xx	si	viola
80. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	x	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	x	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xx	si	viola

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
121. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola-rosso
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
122. sardina	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola-rosso
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA		
123. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
124. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
125. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
126. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
127. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
128. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
129. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
130. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
131. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
132. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
133. sardina	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
134. tonno	24 h	x	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
135. tonno	24 h	x	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
136. tonno	24 h	x	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
137. tonno	24 h	x	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
138. tonno	24 h	x	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
139. tonno	24 h	x	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
140. tonno	24 h	x	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
141. tonno	24 h	x	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
142. tonno	24 h	x	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
143. tonno	24 h	x	si	blu-verde	xxx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
144. tonno	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola-rosso
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola-rosso
145. tonno	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola-rosso
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola-rosso
146. tonno	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola-rosso
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola-rosso
147. tonno	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola-rosso
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola-rosso
148. tonno	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola-rosso
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola-rosso
149. tonno	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola-rosso
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola-rosso
150. tonno	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola-rosso
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola-rosso

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
151. tonno	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola-rosso
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola-rosso
152. tonno	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola-rosso
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola-rosso
153. tonno	24 h	xx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxx	si	blu-verde	xxx	si	viola-rosso
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola-rosso
154. orata	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
155. orata	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
156. orata	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
157. orata	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
158. orata	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
159. orata	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
160. orata	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
161. orata	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
162. orata	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
163. orata	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
164. branzino	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
165. branzino	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
166. branzino	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
167. branzino	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
168. branzino	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
169. branzino	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
170. branzino	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola

		SAM			NIVEN		
		CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE	CRESCITA MICROBICA	CHIARIFICAZION E TERRENO	VIRAGGIO DI COLORE
171. branzino	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
172. branzino	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola
173. branzino	24 h	xxx	si	blu-verde	xx	no	no
	48 h	xxxx	si	blu-verde	xxx	si	viola
	72 h	VIRAGGIO DI TUTTA LA PIASTRA			xxxx	si	viola

Capitolo 4

Conclusioni

Pur non costituendo una grave minaccia per la salute umana, l'istaminosi rappresenta comunque un problema per la sicurezza alimentare. Solitamente questa intossicazione provoca nell'uomo una sintomatologia blanda che perdura al massimo per 24 ore dall'ingestione dell'alimento. Mentre il tasso di morbilità raggiunge il 100% se precedentemente vi è stato il consumo di pesce contenente dosi tossiche di istamina, la letalità (ossia i casi di morte stimati) è molto bassa. L'istaminosi può in ogni caso condurre a problemi sanitari più seri le persone considerate a rischio, ovvero gli individui che assumono determinati medicinali (MAO-inibitori e isoniazide), che sono affetti da patologie croniche e/o debilitanti quali neoplasie, leucemia e mastocitosi, che soffrono di patologie polmonari, cardiache o renali o che assumono abitualmente alcool o droghe che inibiscono gli enzimi MAO e DAO. La diminuzione dell'incidenza dell'*Histamine Fish Poisoning* è un punto cardine per la sicurezza alimentare, in particolare per la crescente domanda da parte dei consumatori di standard alimentari igienici più elevati. Al fine preventivo quindi, è essenziale poter quantificare i livelli di istamina negli alimenti, ma è ancor più fondamentale riuscire ad isolare ed identificare i microrganismi che possiedono la capacità di convertire in istamina l'istidina libera presente in essi. La maggior parte della flora istaminogena non è normalmente presente nel pesce se non in percentuali esigue, ma essa deriva principalmente da contaminazioni post-cattura dovute a manipolazioni non igieniche, in concomitanza con abusi termici e inadeguate procedure di refrigerazione e di eviscerazione, nonché l'utilizzo di materie prime di qualità scadente nei prodotti sottoposti a maturazione enzimatica. I metodi analitici proposti per l'identificazione dei microrganismi istamino-produttori richiedono tempi di interpretazione troppo lunghi e quindi non risultano applicabili ai sistemi di controllo come l'*hazard analysis and control critical point system* (HACCP). Partendo da queste considerazioni sono state effettuate delle analisi sui prodotti della pesca allo scopo di confrontare l'unico terreno finora universalmente utilizzato per l'epidemiologia delle flore istaminogene, ovvero il terreno di Niven, con il *Seawater Agar Medium*, la cui ricetta è stata proposta

nel 2009 da Tao e collaboratori. Nel nostro studio è stato necessario apportare una serie di modifiche al *Seawater Agar Medium* al fine di adattarlo al tipo di campionamento adottato e con lo scopo di migliorarne l'efficacia. Tramite questi tentativi si è infine arrivati all'elaborazione di una formulazione della quale si sono verificati i vantaggi e gli svantaggi rispetto al substrato di coltura di Niven. Nell'utilizzo di quest'ultimo terreno sono emersi alcuni dei problemi segnalati nel corso degli anni da diversi autori. Le difficoltà più evidenti sono state riscontrate nell'interpretazione oggettiva del viraggio di colore. Nello specifico l'incertezza nel considerare come indizio di positività per la produzione di istamina la presenza di colonie viola circondate da un alone del medesimo colore oppure la sola comparsa di un alone viola. Si è inoltre constatato che il terreno subisce modificazioni cromatiche non solo sulla base della presenza di istamina, ma anche a seconda del ceppo microbico che vi è seminato, lasciando in questo modo un eccessivo spazio all'interpretazione soggettiva dei risultati. Il *Seawater Agar Medium* modificato, invece, richiede dei tempi di preparazione più lunghi dovuti al cospicuo numero di elementi che lo compongono e possiede, una volta sintetizzato, una durabilità a temperatura di refrigerazione non superiore alle due settimane. Sulla base delle analisi condotte esso presenta in ogni caso numerosi ed evidenti vantaggi. Innanzitutto consente un'interpretazione oggettiva del viraggio di colore, poiché i ceppi positivi per la produzione di istamina si presentano sempre come colonie blu-verdi circondate da un alone dello stesso colore. Questo viraggio, inoltre, non subisce mai variazioni a seconda dello stipo microbico che vi è seminato. In molte matrici si è rivelato più veloce di 24 ore rispetto al terreno di Niven nell'evidenziazione del viraggio, che era ben distinguibile un giorno dopo la semina dei campioni. In molti casi poi, alcuni ceppi sono risultati positivi sul *Seawater Agar Medium* modificato e negativi sul terreno di Niven. Il pH di questo substrato (5,8) inoltre ha consentito la crescita anche di quelle specie microbiche che venivano inibite dal valore acido di pH del terreno di Niven (5,3). Dall'elaborazione statistica dei dati emerge che, in generale, per una percentuale significativa dei campioni analizzati, il *Seawater Agar Medium* modificato possiede una velocità superiore al terreno di Niven nel rivelare la produzione di istamina tramite il viraggio di colore del substrato. Questa percentuale varia comunque in base alla specie ittica considerata ed è

notevolmente significativa per sgombro, sardina, tonno e branzino, in relazione ai ceppi microbici presenti ed isolati. I risultati ottenuti con 24 ore di anticipo utilizzando il *Seawater Agar medium* modificato sono in ogni caso stati confermati dal viraggio di colore sul terreno di Niven il giorno successivo. Dal test statistico chi quadro infatti, emerge un elevato valore di concordanza tra i dati ottenuti utilizzando i due differenti substrati di coltura. Si ritiene comunque opportuno, al fine di ottenere una conferma dei risultati, l'ulteriore analisi dei ceppi isolati con metodica HPLC. Nel corso della nostra ricerca è emerso inoltre un dato di non secondaria importanza, ovvero l'osservazione che nella maggior parte dei prodotti ittici analizzati vi era la presenza di microrganismi istamino-produttori sia nell'intestino che nelle masse muscolari. Ciò sta a significare che i prodotti della pesca, causa il concomitare di diversi fattori, sono un veicolo significativo di flore istaminogene. Ai fini della prevenzione degli episodi di istaminosi si impone quindi la necessità di isolare ed identificare questi batteri. Sarebbe pertanto auspicabile la prosecuzione di ulteriori studi volti a migliorare ulteriormente l'efficacia del terreno da noi testato e modificato.

Capitolo 5

Riferimenti bibliografici

Ababouch L., Afilal M. E., Rhafiri S. e Benabdeljelil H., 1989. Histamine-producing bacteria isolated from sardines stored in ice and at ambient temperature (25°C). X WAVFH Symposium Stoccolma: 88-100.

Ababouch L., Afilal M. E., Rhafiri S. e Busta F. F., 1991. Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature(25°C). Food Microbiol., 8: 127-136.

Ababouch L., Alaoui M. M. e Busta F. F., 1986. Histamine levels in commercially processed fish in Morocco. J. Food Protect., 49(11): 904-908.

Actis L. A., Smoot J. C., Barancin C. E. e Findlay R.H., 1999. Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. Journal of Microbiological Methods, 39: 79-90.

Al Bulushi I., Poole S., Deeth H.C. e Dykes G.A., 2009. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation . a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 49(4): 369-377.

Arnold S. H. e Brown W. D., 1978. Histamine toxicity from fish products. Advances in food research. 24: 113-154.

Baranowski J., 1985. Assay for histidine decarboxylase activity. Histamine in marine products: production by bacteria, measurement and prediction of formation. FAO Fish. Tech. Pap. 252. FAO, Rome.

Bartholomew B.A., Berry P. R., Rodhouse J. C., Gilbert R. J. e Murray C.K., 1987. Scombrototoxic fish poisoning in Britain: features of over 250 suspected incidents from 1976 to 1986. Epidemiol. Infect., 99: 775-782.

Behling A. R. e Taylor S. L., 1982. Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation. J. Food Sci., 47: 1311-1314, 1317.

Brindani F., Catellani P., Bacci C., Antonetti P. e Sigovini G., 2000. Microrganismi di provenienza ittica: attendibilità del test di Niven e reale potenzialità istaminogena. Atti X Convegno Nazionale AIVI Marsala, 12-14 ottobre 2000.

Bjeldanes L.F., Schutz D.E. e Morris M.M., 1978. On the aetiology of scombroid poisoning: cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea-pig. *Food Cosmet. Toxicol.*, 16(2): 157-159.

Catellani P., 1996. Intossicazione da istamina e controllo sui prodotti della pesca. *Obiettivi & Documenti Veterinari*, 1: 69-78.

Cattaneo P., 2011. Sindrome sgombroide . intossicazione da istamina. *Food In*, 2: 5-80.

Chen C. M., Wei C. I., Koburger J. A. e Marshall M. R., 1989. Comparison of four agar media for detection of histamine producing bacteria in tuna. *J. Food Prot.*, 52: 808-813.

Chen H. C., Kung H. F., Chen W. C., Lin W. F., Hwang D. F., Lee Y. C. e Tsai Y. H., 2008. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. *Food Chemistry* 106: 612-618.

Codex Alimentarius Commission, 1999. Recommended methods of analysis and samplings. *Codex Stan 234*.

Dalgaard P., Emborg J., Kjolby A., Sorensen N. e Ballin N., 2008. Histamine and biogenic amines . formation and importance in seafood. Improving seafood products for the consumer. Borrensen T., ed. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK.

Eitenmiller R. R. e De Souza S. C., 1984. Enzymatic mechanisms for amine formation in fish. *ACS Symposium Series*, 262

Eitenmiller R. R., Orr J. H. e Wallis W. W., 1982. Histamine formation in fish: microbial and biochemical conditions. *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*: 39-50.

Eitenmiller R. R., Wallis J. W., Orr J. H., Phillips R.D., 1981. Production of histidine decarboxylase and histamine by *Proteus morganii*. J. Food Protect, 44(1): 815-820.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal 2011; 9(10): 2393.

Emborg J. e Dalgaard P., 2008. Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans* and *Morganella morganii*. development and evaluation of predictive models. International Journal of Food Microbiology 128: 234-243.

Emborg J., Dalgaard P. e Ahrens P., 2006. *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. International Journal of Systematica Bacteriology 56: 2473-2479.

European Commission, 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.

European Food Safety Authority (EFSA). EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2012. EFSA Journal 2014; 12 (2): 3547.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization), 2013. Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report.

Fletcher C. G., Summers G., Winchester R. V. e Wong R. J., 1995. Histamine and histidine in New Zealand marine fish and shell-fish species, particularly Kahawai (*Arripis trutta*). J. Aquat. Food Prod. Technol., 4: 53-74.

Frank H. A., 1985. Histamine-forming bacteria in tuna and other marine fish. Histamine in marine products: production of bacteria, measurement and prediction of formation. FAO Fish. Tech. Pap., 252: 2-3.

Frank H. A. e Yoshinaga D. H., 1984. Histamine formation in tuna. Seafood toxins. ACS Symposium Series, 262: 443-451.

Giaccone V., Catellani P., Sigovini G. e Antonetti P., 2000. Irregolare distribuzione di istamina nella muscolatura di tonni interi. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, LVII: 375-376.

Giaccone V., 2013. Lezioni del corso di Ispezione degli Alimenti di Origine animale.

Giaccone V., 2012. Lezioni del corso di Igiene e Tecnologia degli Alimenti di Origine animale.

Giaccone V., Relazione di consulenza tecnica d'ufficio su ordinanza del Tribunale Amministrativo Regionale della Liguria (Sezione II) n. 489/2013 21 marzo 2013.

Hall G., Vally H. e Kirk M., 2008. Foodborne Illnesses: Overview. Food Control.

Havelka B., 1967. Role of Hafnia bacteria in the rise of histamine in tuna fish meat. Cesk. Hyg., 12: 343-352.

Hernandez-Herrero M. M., Roig-Sagues A. X., Rodriguez-Jerez J. J. a Mora-Ventura M. T., 1999. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies. J. Food Prot., 62(5): 509-514.

Hungerford J. M., 2010. Scombroid poisoning: A review. Toxicon.

Ienistea C., 1971. Bacterial production and destruction of histamine in foods and food poisoning caused by histamine. Die Nahrung, 15: 109-113.

Ienistea C., 1973. Significance and detection of histamine in foods. The microbiological safety of foods. Academic Press, Londra: 323-343.

Jarisch R., 2004. Histamin-Intoleranz, Histamin und Seekrankheit. 2nd ed. Thieme, Stuttgart.

Jørgensen L. V., Huss H. H. e Dalgaard P., 2000. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. Journal of Applied Microbiology, 89: 920-934.

Jørgensen E. A., Knigge U., Warberg J. e Kjær A., 2007. Histamine and regulation of body weight. Neuroendocrinology 86, 210-214.

Kanki M., Yoda T., Ishibashi M. e Tsukamoto T., 2004. *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. International Journal of Food Microbiology, 92: 79-87.

Karmas E., 1981. Biogenic amines as indicator of food freshness. Lebensm. Wiss. U. Technol., 14: 273-275.

Klausen N. K. e Huss H. H., 1987. A rapid method for detection of histamine producing bacteria. Int. J. Food Microbiol., 5: 137-146.

Kim S. H., Barros-Velazquez J., Ben-Gigirey B., Eun J. B., Jun S. H. e Wei C. I., 2003. Identification of the main bacteria contributing to histamine formation in seafood to ensure product safety. Food Science and Biotechnology, 12: 451-460.

Kimura B., Hokimoto S., Takahashi H. e Fujii T., 2000. *Photobacterium histaminum* Okuzumi et al. 1994 is a later subjective synonym of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (Love et al. 1981) Smith et al. 1991. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50: 1339-1342.

Lehane L. e Olley J., 2000. Histamine fish poisoning revisited. International Journal of Food Microbiology 58: 1-37.

Leitao M. F. F., Baldini V. L. S., Uboldi Eiroa M. N. e Destro M. T., 1983. Bacterias produtoras de histamina em pescado de origem marinha. Col. ITAL, Campinas, 13: 83-98.

Leuschner R. G., Hristova A., Robinson T. e Hugas M., 2012. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) database in support of risk analysis of biogenic amines in food. Journal Of Food Composition and Analysis.

Lopez-Sabater E. I., Rodriguez-Jerez J. J., Hernandez-Herrero M., Roig-Sagues A. X. e Mora-Ventura M. T., 1996. Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*). J. Food Prot., 59: 167-174.

Lyons D.E., Beery J.T., Lyons SA e Taylor S.L.,1983. Cadaverine and aminoguanidine potentiate the uptake of histamine in vitro in perfused intestinal segments of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 70(3): 445-458.

Maintz L. e Novak N., 2007. Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 85(5): 1185-1196.

Matsumiya M. e Otake S., 1981. The investigation of diamine oxidase-like enzymes in the various organs of fishes. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 47(12): 1599-1604.

Mavromatis P. e Quantick P., 2002. Modification of Niven's Medium for the enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use. *Journal of Food Protection*, 65 (3): 546-551.

McMeekin T.A., Olley J., Ross T. e Ratkowsky D. A., 1993. A thermodynamic approach to bacterial growth. *Predictive microbiology: Theory and Application*, Research Studies Press-Wiley, 10: 287-309.

Middlebrooks B. S., Toom P. M., Douglas W. L., Harrison R. E. e McDowell S., 1988. Effects of storage, time and temperature on the microflora and amine development in spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). *J. Food Sci.*, 53 (4): 1024-1029.

Mongar J.L., 1957. Effect of chain length of aliphatic amines on histamine potentiation and release. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 12(2): 198-200.

Niven C. F. Jr., Jeffrey M. B. e Corlett D. A. Jr., 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1): 321-322.

Nuutinen S. e Panula P., 2010. Histamine in neurotransmission and brain diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 709: 95-107.

Owen D.A., Poy E., Woodward D.F. e Daniel D., 1980. Evaluation of the role of Histamine H1 and H2 receptors in cutaneous inflammation in the guinea-pig produced by histamine and mast cell degranulation. *Br. J. Pharmacol.*, 69: 615-623.

Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), 2014. 2013 Annual report. Publications Office of the European Union.

Regolamento (CE) n. 1441/2007 della Commissione, del 5 dicembre 2007, che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.

Rivas R., Garcia-Fraile P., Mateos P. F., Martinez-Molina E. e Velazquez E., 2006. *Photobacterium halotolerans* sp. nov., isolated from Lake Martel in Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56: 1067-1071.

Rodriguez-Jerez J. J. e Mora-Ventura M. T. e Civera T., 1994. Istamina e prodotti ittici: un problema attuale. Parte I: fattori implicati. Industrie alimentari, XXXIII: 299-307.

Rodriguez-Jerez J. J. e Mora-Ventura M. T. e Civera T., 1994. Istamina e prodotti ittici: un problema attuale. Parte II: relazione fra alterazione del pesce e formazione di istamina. Industrie alimentari, XXXIII: 393-399.

Rodriguez-Jerez J. J., Mora-Ventura M. T., Lopez-Sabater E. I. e Hernandez-Herrero M., 1994. Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in spanish salted semi-preserved anchovies, J. Food Prot. 57(9): 784-787.

Roig-Sagues A. X., Hernandez-Herrero M. M., Lopez-Sabater E. I., Rodriguez-Jerez J. J. e Mora-Ventura M. T., 1997. Evaluation of three decarboxylating agar media to detect histamine and tyramine producing bacteria in ripened sausages. Lett. Appl. Microbiol., 25: 309-312.

Ryser E. T., Marth E. H. e Taylor S. L., 1984. Histamine production by psychrotrophic pseudomonads isolated from tuna fish. J. Food Protect., 47 (5): 378-380.

Schlundt J., 2002. New directions in foodborne disease prevention. International Journal Food Microbiology 78: 3-17.

Shahid M., Tripathi T., Sobia F., Moin S., Siddiqui M. e Khan R. A., 2009. Histamine, histamine receptors, and their role in immunomodulation: an updated systematic review. *Open Immunol. J.*, 2: 9-41.

Shalaby A. R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, 29 (7): 675-690.

Tao Z., Sato M., Abe N., Yamaguchi T. e Nakano T., 2009. Simple and rapid detection of histamine-forming bacteria by differential agar medium. *Food Control*, 20: 903-906.

Tao Z., Sato M., Yamaguchi T. e Nakano T., 2009. Formation and diffusion mechanism of histamine in the muscle of tuna fish. *Food Control*, 20: 923-926.

Tauxe R. V., 2002. Surveillance and investigation of foodborne diseases; roles for public health in meeting objectives for food safety. *Food Control* 13: 363-369.

Taylor S.L., 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit. Rev. Toxicol.* 17(2): 91-128.

Taylor S. L., Guthertz L. S., Leatherwood M. e Lieber E. R., 1979. Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* and an incident of scombroid fish poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 37 (2): 274-278.

Taylor S. L., Guthertz L. S., Leatherwood M., Tillman F. e Lieber E. R., 1978. Histamine production by food-borne bacterial species. *J. Food Safety* 1:173-187.

Taylor S.L. e Lieber E.R., 1979. In vitro inhibition of rat intestinal histamine-metabolizing enzymes. *Food Cosmet. Toxicol.*, 17(3): 237-240.

Taylor S. L. e Speckhard M. W., 1983. Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. *Marine Fish. Rev.*, 45 (4-6): 35-39.

Taylor S. L. e Speckhard M. W., 1984. Inhibition of bacterial histamine production by sorbate and other antimicrobial agents. *J. Food Prot.*, 47: 508-511.

Taylor S. L., Stratton J. E. e Nordlee J. A., 1989. Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): an allergy-like intoxication. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 27 (4-5), 225-240.

Taylor S. L. e Woychik N. A., 1982. Simple medium for assessing quantitative production of histamine by *Enterobacteriaceae*, *J. Food Prot.* 45: 747-751.

Tiecco G., Tantillo G., Francioso E. e De Natale G., 1984. Ricerca dell'istamina e di altre poliamine in sgombri e sardine conservati a varie temperature. *Industrie alimentari*, gennaio: 1-8.

Torido Y., Takahashi H., Kuda T. e Kimura B., 2012. Analysis of the growth of histamine-producing bacteria and histamine accumulation in fish during storage at low temperatures. *Food Control*, 26: 174-177.

Tsai Y. H., Lin C. Y., Chang S. C., Chen H. C., Kung H. F., Wei C. I. et al., 2005. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. *Food Microbiology*, 22: 461-467.

World Health Organization (WHO), 2008. WHO Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases. Second formal meeting of the Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (FERG). World Health Organization, Geneva.

Yamani M. I. e Untermann F., 1985. Development of a histidine decarboxylase medium and its application to detect other amino acid decarboxylases. *Int. J. Food Microbiol.*, 2: 273-278.

Yoshinaga D. H. e Frank H. A., 1982. Histamine-producing bacteria in the decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(2): 447-452.

Capitolo 6

Webgrafia

<http://www.biologiamarina.eu/Sgombrotossina.html>

(ultima consultazione 2/01/2015)

<http://www.codexalimentarius.org>

(ultima consultazione 8/01/2015)

http://www.ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm

(ultima consultazione 8/01/2015)

<http://www.efsa.europa.eu/en/publications.htm>

(ultima consultazione 23/12/2014)

<http://www.eolabs.com/baird-parker-agar.html>

(ultima consultazione 19/01/2015)

<http://www.eur-lex.europa.eu/collection/eu-law/legislation/recent.html>

(ultima consultazione 8/01/2015)

<http://www.fda.gov/Food/>

(ultima consultazione 10/01/2015)

<http://www.izsvenezie.it>

(ultima consultazione 19/12/2014)

http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/

(ultima consultazione 10/01/2015)

http://www.who.int/topics/food_safety/en/

(ultima consultazione 10/01/2015)

Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto il mio relatore, chiarissimo professor Valerio Giaccone, che con le sue appassionanti lezioni mi ha aperto il mondo di questa affascinante materia. Un grazie inoltre per avermi concesso l'opportunità di approfondire i miei interessi attraverso il lavoro condotto insieme.

Ringrazio il mio correlatore, dottor Riccardo Miotti Scapin, per tutto il tempo e la pazienza dedicatemi in questi anni e per il suo prezioso aiuto.

Ringrazio il professor Ehab Salama per l'interessante collaborazione e lo scambio culturale che la sua presenza ha reso possibile.

Un grazie di cuore ai miei genitori che mi hanno sostenuto con il loro amore, il loro interesse costante e per la fiducia che hanno sempre nutrito nei miei confronti. Ringrazio mia mamma per aver rappresentato una guida premurosa e presente nel mio percorso di crescita personale, mio papà per aver sempre creduto con orgoglio in me e in tutte le mie scelte.

Ringrazio gli zii Grazia e Gigi. Il loro affetto e il loro aiuto sono stati sempre per me solidi sostegni.

Grazie alla nonna, che mi ha affiancato con la sua arma potente, la preghiera.

Ringrazio Francesca per l'indissolubile rapporto di amicizia che ci ha legate sin dai primi anni di vita. Grazie per essermi stata accanto come una sorella nei momenti per me importanti.

Grazie a Bottax per avermi sempre ascoltato con pazienza e per essere corso in mio aiuto nelle situazioni di crisi.

Grazie a Gregorio, Elisabetta, Stefano e Gabriele per aver fatto del laboratorio un luogo familiare e allegro.

Grazie a Vittorio per tutte le risate che mi ha fatto fare e per avermi tormentato con telefonate infinite.

Ringrazio Federica, la mia tiraossi preferita, per essere stata la mia coscienza in tutte le vicende tribolate della mia vita.

Grazie Masa per l'amicizia che mi ha accompagnato sin dagli anni dell'adolescenza.

Ringrazio Giulia, Chiara, Gaia, Beatrice e Martina per aver reso l'appartamento di via Vesalio la mia seconda casa.

Grazie a Fede, Chiara, Madeo, Simon, Franci, Giulia, Matteo, Schelli e Maria per tutti gli indimenticabili momenti condivisi e per aver fatto sì che l'università fosse un posto in cui aver voglia di far ritorno.

Grazie infine al mio gatto Aciaci per tutte le coccole e i sonni fatti insieme da 15 anni a questa parte.