

HISTAMINA (escombrotóxina). Revisión*

Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (ITP)

Dirección de Investigación y Desarrollo

Por:

Blgo. Miguel Albrecht , Ing. Alberto Salas

Relación con la Salud

La histamina es un compuesto de presencia normal en el organismo que se forma a partir de la descarboxilación del aminoácido L-histidina.

Es sintetizada y almacenada en células especializadas, principalmente mastocitos (células sub-epiteliales de los tejidos) y basófilos de la sangre, que regulan su liberación de acuerdo a la necesidad. Debido al comportamiento de su anillo imidazólico que se encuentra ionizado a pH fisiológico, la histamina resulta implicada en actividades biológicas normales y subnormales siendo un mensajero químico que media un amplio rango de respuestas celulares que incluyen reacciones alérgicas e inflamatorias, vasodilatación, secreción gástrica y neurotransmisión.

Histidina Histamina

Puede existir en una variedad de formas a diversos pH, así por ejemplo a pH de 7,4 se le encuentra en estado ionizado con un sitio protonado en su cadena. Como consecuencia de un pequeño cambio de pH, de seis a siete, la histamina puede cambiar de ser un aceptor de cargas, a ser un donador de cargas; por eso que, no debe sorprendernos que debido a estas propiedades electrónicas, la histamina presente una actividad fisiológica muy importante.

El nivel de histamina en la sangre normalmente se reporta entre los 25 y 130 ug/Lt, este rango puede alterarse en caso de estimulación. Cuando el nivel de histamina circulante es elevado, se generan desequilibrios que alteran el estado normal del individuo.

La liberación de histamina de las células es la primera respuesta frente a algunos estímulos; entre estos se incluyen la presencia de toxinas bacterianas, picaduras de insectos, destrucción celular por cambios de temperaturas extremas, traumas, alergias, anafilaxis y reacciones de hipersensibilidad.

El mecanismo de acción de la histamina sobre los tejidos describe su efecto sobre la unión de dos tipos de receptores designados como H1 y H2 que están localizados en la superficie de las células blanco, teniendo distintos tipos de acción en diferentes tejidos de acuerdo al receptor al que estén unidos.

Así, cuando la histamina esta actuando sobre el receptor H1 solamente, el músculo liso bronquial e intestinal se contraen, las terminaciones nerviosas causan dolor y picazón y se incrementa la producción de moco bronquial y nasal. Cuando actúa solo sobre el receptor H2, en el estómago se estimula la secreción del ácido clorhídrico. Cuando está unido a ambos receptores, el sistema cardiovascular sufre vasodilatación periférica (baja presión arterial), mientras aumenta la permeabilidad de los otros capilares con pérdida de fluidos (edemas, zonas enrojecidas).

La histamina exógena, es decir, histamina que no es sintetizada por el organismo, sino que su presencia está ligada al consumo de alimentos usados como vehículos para su ingreso al organismo, genera una enfermedad conocida comúnmente como "intoxicación" con un período de incubación típicamente corto, subsistiendo los síntomas por unas pocas horas en la mayoría de los casos (16).

La intoxicación por histamina presenta síntomas de naturaleza neurológico-cutánea, gastrointestinal y hemodinámica, observándose luego del consumo del alimento: edema, inflamación, dolor de cabeza, palpitaciones, enrojecimiento, hormigueo, urticaria, quemazón, comezón, sarpullidos, náusea, vómito, diarrea, calambres e hipotensión (16, 17).

La severidad de los síntomas de la intoxicación dependerá entonces de la cantidad de histamina consumida, de la presencia de otros reaccionantes, sinérgicos y antagónicos, así como de la sensibilidad del paciente a la ingestión de éstos compuestos. El diagnóstico de la enfermedad debe ser estudiado con mucho detenimiento, pues puede ser confundida con una "alergia" por consumo de alimentos. Así, la intoxicación debe ser distinguida por presentar:

- Carencia de historias previas de reacciones alérgicas (antecedentes) por consumo de algún alimento en particular.
- Presencia de intoxicación en más de una persona
- Detección de altos niveles de histamina en el alimento consumido

Algunos alimentos como pescados y mariscos, quesos (especialmente los de prolongada maduración), jamones y otros de tipo fermentado, contienen algunas veces, elevados niveles de histamina y han sido involucrados en apariciones de intoxicación (2).

Normalmente pequeñas cantidades de histamina presentes en la dieta casi no tienen efectos dañinos, pues éstas son removidas por la flora presente en el tracto digestivo impidiendo su absorción, sin embargo, en algunos casos, la histamina presente en altas concentraciones, atraviesa la barrera gastrointestinal, en cuyo caso puede ocurrir la intoxicación; la intensidad de ésta, dependerá de las concentraciones circulantes de histamina.

La escombrototoxicosis es un tipo de intoxicación alimentaria que ha sido referida al consumo de pescados escómbridos tales como el atún, caballa, bonito, etc.; aunque especies de las familias Cupleidae (sardina), Engraulidae (anchoveta), Scaridae (perico), etc., han sido también involucrados (2, 3, 10). Aún faltan definir muchos parámetros respecto a este tipo de intoxicación tales como concentraciones tóxicas, potenciadores, grado de respuestas en cada individuo, presencia de otras toxinas, etc.

En la mayoría de casos, los niveles de histamina encontrados en pescados asociados a la enfermedad conocida como escombrototoxicosis, están por encima de los 200 ppm y más comúnmente, por encima de 500 ppm (4). Sin embargo, se sospecha que otros productos químicos también juegan un rol importante en la aparición de la enfermedad, como son otras aminas biogénicas, toxinas, inhibidores enzimáticos, etc. que se generan por acción bacteriana y no se destruyen durante los procesos de congelación, cocción, curado o conservación (16).

Si bien se ha encontrado una relación directa entre la intoxicación y el consumo de pescado que contiene niveles elevados de histamina (17); aún no se ha determinado al agente causal en sí de la escombrototoxicosis, pues no se ha logrado reproducir la enfermedad al administrar histamina pura a voluntarios que si enfermaron al consumir dosis semejantes en pescado (6, 11).

Lamentablemente no existe una buena relación estadística sobre la incidencia / prevalencia del envenenamiento por histamina (escombrotóxina), debido principalmente a la falta de programas de salud y a las características propias de la enfermedad que es de curso muy corto; siendo la terapia antihistamínica el tratamiento óptimo para este tipo de intoxicación (6, 16, 17).

El conocimiento actual sobre los mecanismos de la escombrototoxicosis no es a la fecha definitivo. Se considera necesaria la revisión de los estudios científicos referentes, para establecer o modificar los límites de acción legal en el nivel de histamina a fin de establecer normas sanitarias.

Histamina ¿Responsable de la Escombrototoxicosis?

Mientras no se determine la identidad de las toxinas involucradas en el envenenamiento, los niveles y la acción de los potenciadores, es imposible definir una dosis tóxica para la histamina presente en los pescados.

Administrando hasta 4 mg de histamina pura / kg de peso corporal a voluntarios controlados no se lograron tener efectos de toxicidad, mientras que con sólo administrar filetes de caballa con histamina, a estos mismos voluntarios (0,3 mg de histamina / kg de peso corporal), se produjeron síntomas de envenenamiento (6, 11).

La falta de toxicidad de la histamina pura, dada en forma oral aún en niveles elevados, y, la toxicidad generada por la ingestión de pequeñas dosis de histamina en pescado, lleva a sospechar de la presencia de algunos "potenciadores de toxicidad" en el pescado descompuesto. Entre los posibles potenciadores están la trimetilamina, el óxido de trimetilamina y otras aminas biogénicas tales como la putrescina, la cadaverina, anserina, espermina, espermidina y agmatina. Los estudios hechos con dichos "potenciadores" aún no han llegado a conclusiones determinantes. La existencia de inhibidores de la diamino oxidasa y de la histamina metil transferasa, también incrementarían la toxicidad, debido a que la remoción de las aminas biogénicas a nivel del tracto digestivo se vería perjudicada, ingresando las aminas en forma activa al torrente sanguíneo (2, 16).

Estudios con voluntarios médicamente controlados, han demostrado que, las aminas encontradas comúnmente en la caballa no son agentes responsables de la escombrototoxicosis, no presentando acción individual, aditiva o sinérgica ni otro tipo de respuestas a dosis típicas. Estos mismos estudios sugieren que la liberación de la histamina endógena (histamina liberada por los mastocitos), es la que juega un rol importante en la intoxicación (5, 6, 11).

Por otro lado, hay evidencias que señalan que algunos peces podrían acumular toxinas marinas provenientes de sus alimentos (plankton, larvas de crustáceos, huevos de peces, juveniles, etc.), y generar intoxicaciones de manera similar a la escombrotóxina, aunque aún faltan mayores estudios al respecto (5).

Todas éstas observaciones conducen a suponer que la escombrotóxina es el agente degranulante de los mastocitos, y, que los síntomas del envenenamiento son debido a la liberación de la histamina endógena y otras sustancias biológicamente activas, liberadas por nuestro organismo (11).

Podemos pensar que algunas moléculas de origen externo (histamina, otras aminas biogénicas, inhibidores enzimáticos y toxinas), en conjunto, presenten una acción aditiva y/o potenciadora de la intoxicación, todo dependería de la concentración de cada una de ellas y de su efecto sobre las características propias del hospedero; no debiendo involucrar solo a una molécula como la responsable de la escombrototoxicosis.

La toxicidad de la Histamina

Si bien no se puede hablar directamente de la histamina como único agente responsable de la escombrototoxicosis, de lo que no hay duda es, de la relación directa entre la aparición de la intoxicación y de la presencia de niveles elevados de histamina en los pescados consumidos (4, 17). La dosis tóxica mínima no ha sido aún establecida, debido a la variabilidad de los niveles de histamina en el pescado descompuesto, así como a la variabilidad de respuesta de los pacientes.

La dosis tóxica a fines de la década de los 50 fue establecida en 60 mg/100 g, aunque con el correr de los años este dato ha sido cuestionado y corregido (20).

Estudios epidemiológicos, han llegado a las siguientes conclusiones para la concentración de histamina en los pescados (4):

< 5 mg/100g de Hm (< 50 ppm): Pescado normal, seguro para su consumo.
5 - 20 mg/100g de Hm (50 - 200 ppm): Pescado maltratado y posiblemente tóxico.
20-100 mg/100g de Hm (200 - 1000 ppm): Pescado no satisfactorio probablemente tóxico.

A continuación presentamos algunas regulaciones que establecen límites máximos permisibles (límites críticos) para la comercialización y consumo de pescado y sus productos:

Según el Diario Oficial de las Comunidades Europeas del año 1991 (8) en lo referente a las modalidades de control en las pruebas químicas sobre histamina, se dictamina:

- Se tomarán 9 muestras de cada lote para ser estudiadas
- Su valor promedio deberá ser inferior a 10 mg/100g (100 ppm)
- Dos de las muestras podrán tener un valor superior a 10 mg/100g (100 ppm) e inferior a 20 mg/100 g (200 ppm)
- Ninguna de las muestras podrá tener un valor superior a 20 mg/100 g (200 ppm)

Estos niveles máximos se aplicarán únicamente a los pescados de la familia de los Escómbridos y Cupleidos. Los pescados de dichas familias que hayan sido sometidos a maduración enzimática en salmuera, podrán presentar un contenido histamínico más elevado, pero sin superar el doble de los valores indicados anteriormente (ninguna muestra excederá los 400 ppm). Estas pruebas deberán realizarse con métodos fiables y científicamente reconocidos.

Cabe puntualizar que, si bien la norma europea solo contempla a los escómbridos y a los cupleidos, actualmente, algunos países como Nueva Zelanda, está considerando especies de riesgo a todas aquellas que contengan un alto contenido de histidina libre en el músculo (10); así también, el Arenque del Atlántico (cupleido), inicialmente considerado entre el grupo de especies afectadas por la formación de histamina, ha sido retirada de la lista de Guía de Peligros que maneja FDA de Estados Unidos.

Reglamentaciones dadas por los Estados Unidos, sobre niveles de histamina en pescados están contemplados en la guía de la FDA (Food and Drugs Administration). La Guía de Control y Peligro de Pescados y Productos Pesqueros de la FDA del año 1997 (9) establece que los niveles de histamina no deberán exceder los 5 mg/100 g (50 ppm) para pescado fresco y de los 20 mg/100 g (200 ppm) para pescado enlatado.

Respecto a los cupleidos del mar peruano como la sardina (*Sardinops sagax sagax*), el machete de hebra (*Opisthonema libertate*) y el machete (*Ethmidium maculatum*), deben ser consideradas especies de riesgo, pues se ha reportado niveles elevados de histamina en éstos; igualmente podemos nombrar a la anchoveta, que, cuando no es tratada cuidadosamente, genera niveles elevados de histamina. En el Instituto Tecnológico Pesquero se tienen datos de hasta aproximadamente 300 mg Hm/100g para la sardina y anchoveta.

En nuestro medio no existe calificación ni reglamentación para el consumo de pescado fresco o de productos provenientes de pescado (conservas, curados, pastas, etc.); sin embargo podemos tomar en cuenta valores dados por la FDA y adaptarlos a nuestros fines.

En la calificación del producto debe tenerse en cuenta tanto los factores intrínsecos (proteína, histamina, bases volátiles, etc.) como su aporte en la masa total del alimento a consumirse. Así por ejemplo, la harina de pescado, que es usada como ingrediente en la preparación de alimentos balanceados y ésta solo aporta alrededor de un 10% del total del producto, entonces, una harina de 250 ppm en un alimento balanceado aportará solo un décimo (1/10) de su masa, el valor final de histamina en el alimento será de 25 ppm (valor no peligroso).

La calificación general promedio solicitado por los compradores de harinas de pescado peruanas, referentes a la concentración de histamina es:

- Harina Super-Prime: Concentración por debajo de 250 ppm
- Harina Prime: Concentraciones que llegan hasta 600 ppm
- Harinas Estándar: Por encima de 600 ppm (existiendo diferentes calidades)

Formación de Histamina y su relación con la descomposición de productos pesqueros
Algunas especies de pescados contienen naturalmente grandes cantidades de histidina libre en sus tejidos; además que la proteólisis, ya sea autolítica o bacteriana, puede jugar a su vez un rol importante en la liberación de más histidina que puede servir como sustrato a la histidina descarboxilasa bacteriana (2).

La formación de histamina es resultado del mal manipuleo y una mala preservación del pescado; generalmente pescados almacenados en lugares con poca higiene y a temperaturas por encima de las de refrigeración en tiempos prolongados, son susceptibles a formar grandes cantidades de histamina, siempre que presenten histidina libre en sus músculos.

Algunas malas prácticas de captura, generalmente cuando al pescado se le ha permitido luchar sobre la línea por un período relativamente prolongado de tiempo, pueden causar un incremento de la temperatura interna, favoreciendo el crecimiento bacteriano, formandose histamina antes de que el pescado esté sobre la embarcación.

Existen medios microbiológicos enriquecidos con extractos de músculo de pescado que permiten aislar y cuantificar las bacterias formadoras de histamina. Diversas referencias indican que sólo un porcentaje menor de microflora contaminante, es responsable de la formación de histamina, lo cual nos llevaría a concluir que, no siempre los niveles de histamina indican el mal estado del producto, pues el pescado también puede ser contaminado con bacterias que no producen histamina, formando otros productos de descomposición (2, 15).

Se han reportado ocurrencias de formación de histamina aún a temperaturas moderadas (entre los 4 y los 10°C) siendo todavía tema de controversia (7, 12, 14). Las bacterias formadoras de histamina son capaces de crecer y producirla en un amplio rango de temperaturas, sin embargo, su acción es más rápida a temperaturas que fluctúan alrededor de 21°C o más (3, 10, 14).

Las bacterias asociadas a la formación de histamina están comúnmente sobre las agallas y en los intestinos del pez vivo sin originar daño; una vez muerto el pez, sus mecanismos de defensa no inhiben el crecimiento bacteriano, aumentando el número de bacterias que aprovechan la histidina libre presente en el medio (2).

Enterobacterias (especialmente especies de *Proteus* y *Klebsiella*) forman histamina como producto secundario de su metabolismo por acción de su enzima histidina descarboxilasa (1, 16). Al investigar la microflora responsable de la descomposición, es importante identificar a las bacterias formadoras de histamina, a fin de determinar el porcentaje de la población bacteriana total que ellas representan (3).

Las bacterias intestinales formadoras de histamina más abundantes en el pescado son: *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y *Hafnia alvei*, éstos han sido aislados de pescados implicados en la mayoría de envenenamientos (2). Ciertas bacterias no intestinales del pescado son también capaces de producir histamina en condiciones de anaerobiosis (*Clostridium perfringens*); a temperaturas de refrigeración (la psicrófila *Photobacterium* spp); a temperaturas de refrigeración y salinidad elevada, perteneciendo a este último un grupo de bacterias psicrófilas y halófilas denominadas "bacterias grupo-N" (12, 13, 14, 15, 19).

La mayor parte de estudios toman como consenso que las bacterias formadoras de histamina son principalmente organismos mesófilos (adaptados a temperaturas entre los 20 y 37°C), sin embargo, se ha demostrado que *Klebsiella pneumoniae* es capaz de producir histamina a 7°C después de prolongados períodos de almacenamiento; y las aún no identificadas "bacterias grupo-N", que parecen formar parte de la microflora normal de la superficie del pescado, son capaces de producir histamina a temperaturas de hasta 2,5°C (2, 3).

Se ha observado también la aparición de histamina en filetes empacados al vacío y almacenados a temperaturas de refrigeración, así como en productos salados almacenados a 5°C; el principal argumento para esta formación es que, una vez presente la enzima histidina descarboxilasa, ésta puede continuar la producción de histamina en el pescado, aún cuando la bacteria deje de ser activa (muerta o con metabolismo mínimo). La enzima puede continuar activa a temperaturas de refrigeración y es probablemente más estable en estado congelado que dentro de la célula bacteriana misma (mínima acción de proteasas), pudiendo reactivarse muy rápidamente durante el descongelamiento (16).

Tanto las enzimas como las bacterias pueden ser inactivadas por cocción; sin embargo una vez que la histamina ya está formada no es posible eliminarla.

Después de la cocción del pescado, la recontaminación con bacterias formadoras de histamina es poco probable (por la menor proporción de ellas en el ambiente), por esta razón el desarrollo de histamina es más frecuente en pescados crudos.

Control en la Formación de Histamina

Considerando que el efecto de la temperatura en la formación de histamina es determinante, el rápido enfriamiento del pescado después de muerto es la principal estrategia para prevenir la formación de histamina (escombrotóxina). El almacenamiento a bajas temperaturas después de la captura, es la clave para el control en la acumulación de la histamina bacteriana en el pescado, aunque, es necesario aún investigar más a fondo la formación de histamina en el almacenaje a bajas temperaturas.

La temperatura interna del pescado deberá ser llevada a 10°C o menos durante las primeras 6 horas después de capturado el pez. Luego de éste enfriamiento inicial, es recomendable llevar a los pescados por debajo de los 4°C dentro de las 18 horas siguientes; éstas acciones previenen, el crecimiento bacteriano y acción de la histidina descarboxilasa (9). Una vez que la enzima esté formada el control del peligro es improbable.

Se debe tener en cuenta también las variaciones estacionales de los aminoácidos libres en el músculo del pescado. Existe información que nos indica que la concentración de histamina libre en el músculo varía según las estaciones, llegando a concluir que existen épocas donde hay más susceptibilidad para formar mayor concentración de histamina (22).

Estudios relacionados a la preservación del pescado (18), encontraron que, tanto el uso del ácido propiónico como del ácido acético, en cantidades adecuadas, retardan el crecimiento bacteriano; por tanto, el uso de éstos preservantes, puede conducir a una menor formación de histamina, otras aminas biógenas u otros productos provenientes del deterioro. Actualmente se están estudiando otros inhibidores del crecimiento bacteriano de origen natural (bactericidas y/o bacteriostáticos) con la finalidad de disminuir la formación de productos de descomposición.

Métodos para la Detección de histamina

Existen numerosos métodos para la detección y análisis de histamina. Las técnicas más tempranas comprendían bioensayos con una relativa aproximación debido a una respuesta propia en cada individuo, éstas técnicas ya han sido reemplazadas por ensayos químicos más agudos y precisos; entre éstos se encuentran procedimientos cromatográficos, colorimétricos, fluorométricos, enzimáticos, etc.

Aceptadas oficialmente son las técnicas cromatográficas y fluorométricas, aunque el inconveniente de éstas reside en la duración del ensayo y el presentar un costo mayor.

Se encuentran en el mercado métodos de detección muy acertada, basados en sistemas inmunológicos, son bastante rápidos pero aún no son oficialmente reconocidos; también las técnicas enzimático-colorimétricas, que si bien no resultan ser muy precisas, tienen a su favor el ser bastante económicas y no necesitar de lugares especiales para poder ser realizados, obteniéndose aproximaciones bastante útiles para trabajos en planta.

*El presente artículo ha sido publicado en INFOPECA Internacional Nº 8 abril-junio 2001

Bibliografía

1. Arnold H., Price R., Brown D. 1980. Histamine formation by bacteria isolated from Skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries, 46 (8): 991-995.
2. Ababouch Lahsen. 1991. Envenenamiento de Alimentos por Histamina. Tech. Fish News, 11 (1): 3 - 5.
3. Ababouch L., Afilal M., Benabdeljelil H., Busta F. 1991. Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28°C) in ice. International Journal of Food Science and Technology, 26: 297-306.
4. Bartholomew B., Berry P., Gilbert R., Murray C. 1987. Scombrototoxic fish poisoning in Britain: Features of over 250 suspected incidents from 1976 to 1986. Epidemiol. Infect. 99: 775-782.
5. Clifford M., Walker R., Ijomah P., Wright J., Murray C., Hardy R., Martlbauer P., Usleber E. and Terplan G. 1993. Do Saxitoxin-like substances have role in scombrototoxicosis?. Food Additives and Contaminants. 9 (6): 657 - 667.
6. Clifford M., Walker R., Ijomah P., Wright J., Murray C. and Hardy R. 1991. Is there a role for amines other than histamines in the aetiology of scombrototoxicosis?. Food Additives and Contaminants. 8 (5): 641 - 652.
7. Dawood A. 1988. The Occurrence of non-volatile amines in chilled-stored rainbow trout (*Salmo irideus*). Food Chemistry. 27: 33-45.
8. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 24.9.91. Capítulo V. Control Sanitario e Inspección de las Condiciones de Producción. Nº L 268/30-31
9. FDA. U.S. Food and Drugs Administration. Fish and Fishery Products Hazard and Control Guide. 1997.
10. Fletcher, G., Summers, G., Winchester, R., Wong, R. 1995. Histamine and histidine in New Zealand Marine Fish and Shellfish species, particularly Kahawai (*arripis trutta*). Journal of Aquatic Food Product Technology, 4 (2): 53 - 74.
11. Ijomah P., Clifford M., Walker R., Wright J., Hardy R. and Murray C. 1991. The importance of endogenous histamine relative to dietary histamine in the aetiology of scombrototoxicosis. Food Additives and Contaminants. 8 (4): 531 - 542.
12. Kazuhisa Y., Echigo T. 1992. Occurrence of halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria in red meat fish products. Nippon Suisan Gakkaishi 58 (3): 515- 520.
13. Morii H., Cann D., Taylor L. 1988. Histamine formation by Luminous Bacteria in Mackerel Stored at Low Temperatures. Nippon Suisan Gakkaishi, 54 (2): 299- 305.
14. Okuzumi M., Awano M., Ohki Y. 1984. Effects of temperature, pH value and Na Cl concentration on histamine formation of N-group bacteria (Psychrophilic and Halophilic histamine-forming bacteria). Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries, 50 (10): 1757-1762.
15. Omura Y., Price R., Olcott S. 1978. Histamine forming bacteria isolated from spoiled skipjack tuna and jack mackerel. Journal Food Science, 43: 1779 - 1781
16. Taylor Steve. 1986. Histamine Food Poisoning: Toxicology and Clinical Aspects. Critical Reviews in Toxicology, 17 (2): 91 - 127
17. Van Gelderen C., Savelkoul T., Ginkel L., Dakkum W. 1992. The effects of histamine administered in fish samples to healthy volunteers. Clinical Toxicology. 130 (4): 585-596.
18. Windsor M., Thoma T. 1974. Chemical preservation of industrial fish: new presentation mixtures. Journal Science Food Agriculture, 25: 993-1005.
19. Yoguchi R., Okuzumi M., Fujii T. 1990. Seasonal variation in number of halophilic histamine-forming bacteria on marine fish. Nippon Suisan Gakkaishi 56 (9): 1473-1479.
20. Staruszkiewics, W., Waldron, E., Bond, J. 1977. Decomposition in Foods. Fluorometric

Determination of Histamine in Tuna:Development of Method. Journal of the AOAC, 60 (5):1125-1136.

21. Watanabe, K., Uehara, H., Sato, M., Konosu, S. 1985. Seasonal variation of extractive nitrogenous constituents in the muscle of the *Halocynthia roretzi*. Bull. Of the Jap. Soc. Scien. Fish. 51 (8): 1293-1298.