UNIVERSIDAD DE CUENCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

"DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HISTAMINA EN LA ESPECIE *Thunnus Alalunga*, EXPENDIDO EN EL MERCADO MUNICIPAL '10 DE AGOSTO', CUENCA - ECUADOR."

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO Y FARMACÉUTICO

AUTORES:

Christian Gabriel Montesel Pastuzo.

CI: 0104360748

Franklin Omar Rodríguez Tapia.

CI: 0104909601

DIRECTORA:

Dra. Mariana Elizabeth Saá Cruz, Mg.

CI: 0102654522

ASESOR

Dr. Fausto Zaruma Torres, PhD.

CI: 1102127980

CUENCA-ECUADOR

2017

RESUMEN

En el presente estudio se determinó la concentración de histamina, en pescado fresco de la especie *Thunnus alalunga*, las muestras para el análisis se obtuvieron en el mercado municipal 10 de Agosto de la ciudad de Cuenca, empleando un total de 192 muestras, que se analizaron con el kit Veratox® para histamina por el método de ELISA (Enzymelinked immunosorbent assay).

Se encontró, luego del estudio, que un 18,7% del total de las muestras de atún analizadas presentaron valores superiores a los permitidos por la FDA (Food and Drug Administration), el cual refiere como límite permitido 50ppm, lo que indica que determinados puestos de venta no cumplen las condiciones ideales de conservación y mantenimiento de este producto para su comercialización y que podría representar un riesgo para la salud del consumidor.

Palabras clave: Histamina, Atún, *Thunnus alalunga,* Veratox®.

ABSTRACT

In this study the concentration of histamine was determined in fresh fish species Thunnus alalunga, samples for analysis were obtained at the municipal market August 10 Cuenca, using a total of 192 samples, they were analyzed with Veratox® kit for histamine by the ELISA method (Enzymelinked immunosorbent assay).

It was found, after the study, that 18.7% of the total tuna samples analyzed had values higher than those allowed by the Food and Drug Administration (FDA), which refers to a permitted limit of 50ppm, indicating that certain Stalls do not meet the ideal conditions of conservation and maintenance of this product for marketing and could pose a risk to consumer health.

Key words: Histamine, Tuna*, Thunnus alalunga,* Veratox®.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA TABLAS

LISTA FIGURAS

LISTA GRÁFICOS

LISTA ANEXOS

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

AB	Aminas Biógenas
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ARCSA	Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria
BAL	Bacterias del Ácido Láctico
cm	Centímetros
°C	Centígrados
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ETA	Enfermedades Trasmitidas por alimentos
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramo
H	Histamina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
M	Mercado
mg	Miligramos
ml	Mililitro
nm	nanómetro
P	Puestos de mercado
ppm	Partes por millón
T.	Thunnus

µl	Microlitro
Vit.	Vitamina

CLÁUSULAS DE DERECHO DE AUTOR

Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Franklin Omar Rodriguez Tapia, autor del Trabajo de Titulación "DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HISTAMINA EN LA ESPECIE *Thunnus Alalunga*, EXPENDIDO EN EL MERCADO MUNICIPAL 10 DE AGOSTO, CUENCA – ECUADOR", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 04 de mayo del 2017

Franklin Omar Rodriguez Tapia

C.I: 0104909601

CLÁUSULAS DE DERECHO DE AUTOR

Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Christian Gabriel Montesel Pastuzo, autor del Trabajo de Titulación "DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HISTAMINA EN LA ESPECIE *Thunnus Alalunga*, EXPENDIDO EN EL MERCADO MUNICIPAL 10 DE AGOSTO, CUENCA – ECUADOR", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 04 de mayo del 2017

Christian Gabriel Montesel Pastuzo

C.I: 0104360748

CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTAL

Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Franklin Omar Rodriguez Tapia, autor del Trabajo de Titulación "DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HISTAMINA EN LA ESPECIE *Thunnus Alalunga*, EXPENDIDO EN EL MERCADO MUNICIPAL 10 DE AGOSTO, CUENCA – ECUADOR", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 04 de mayo del 2017

Franklin Omar Rodriguez Tapia

C.I: 0104909601

CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTAL

Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Christian Gabriel Montesel Pastuzo, autor del Trabajo de Titulación "DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HISTAMINA EN LA ESPECIE *Thunnus Alalunga*, EXPENDIDO EN EL MERCADO MUNICIPAL 10 DE AGOSTO, CUENCA – ECUADOR", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 04 de mayo del 2017

Christian Gabriel Montesel Pastuzo

C.I: 0104360748

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a:

¨Mis padres: Luis y Liliana, por su amor trabajo y sacrificios, gracias a ustedes he logrado llegar hasta donde estoy y convertirme en lo que soy. Es un honor ser su hijo, son los mejores¨. Los adoro.

¨Mi esposa: Fernanda, un día decidiste acompañarme y escribir esta historia, tu apoyo ha sido un pilar fundamental, has estado junto a mí, incluso en los momentos más difíciles. Estoy muy agradecido por compartir este amor con una persona tan maravillosa¨. Te amo.

¨A mi hijo: Thomas, en este instante no entenderás mis palabras, pero cuando seas capaz quiero que recuerdes lo que significas para mí, eres la razón de mi alegría, mi principal motivación, mi orgullo y mi esperanza¨. Te quiero.

¨A mi amigo: Franklin, quien con su esfuerzo y apoyo que me ha brindado, he logrado culminar esta esta de mi vida profesional¨. Éxitos.

Gabriel

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo, a mis alumnos de la Unidad Educativa Nuestra Familia, pero con especial énfasis y mucho cariño a los segundos de bachillerato A y B 2016-2017, por enseñarme que ejercer una profesión también es brindar todo lo aprendido a los demás y que esa es la mejor manera de contribuir a una sociedad, compartiendo no solo conocimientos académicos, sino también vivencias extraordinarias como humanos. Les dedico este trabajo porque de ellos aprendí, a ver la educación desde la otra cara de la moneda, ya no como estudiante, sino desde esta ardua tarea, de ser docente. Va para ustedes porque tengo fe que serán quienes ayuden a mejorar este planeta con sus conocimientos y entusiasmo.

Franklin

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera especial a la Dra. Mariana Saá, Mgt. directora de este trabajo de investigación, por brindarnos su paciencia, apoyo e invaluable guía durante todo este trabajo de titulación, que nos permite alcanzar esta meta profesional.

Al Dr. Fausto Zaruma, PhD. por su predisposición y sabios consejos aportados, cuando más lo necesitamos.

A la Ing. Alexandra Cerezo, gerente de ventas de APRACOM. S.A, por su apoyo y gestión en la adquisición de materiales y equipos para el estudio.

A la Dra. María Montaleza, Mgt. por ayudarnos con todo el material de laboratorio necesario durante el desarrollo práctico.

INTRODUCCIÓN

Las aminas biógenas son componentes de tipo orgánico de bajo peso molecular y en su estructura química presentan al menos un grupo amino (Fernandez & Alvarez, 2005). Se producen por descarboxilación de aminoácidos en procesos de putrefacción por acción de enzimas microbianas, por lo que también se consideran indicadores de alteración alimenticia (Sánchez, 2005). Este tipo de compuestos están presentes en los alimentos que se consume habitualmente pudiendo provocar efectos de tipo perjudiciales sobre la salud y dependiendo de su estructura los tipos son: histamina, putrescina, cadaverina etc. (Huss, 1997).

Con relación a la histamina, los alimentos que presentan esta biotoxina son los mariscos, quesos (corteza), carnes (ahumadas), pescados, embutidos, entre otros. (Institut Ferran de Reumatologia , 2010).

La inadecuada manipulación y conservación del pescado crudo favorecen la contaminación y proliferación de microorganismos, que no solo pueden afectar directamente la salud del individuo, sino que también pueden hacerlo de manera indirecta a través de los metabolitos que forman, como en el caso de la histamina a partir de la histidina (Texeiria, Azevedo, & Carmona de Sao, 2001). Sin embargo, la carga microbiana propia y la incorporada en los procedimientos post-captura encuentran en el pescado un medio excelente para ser colonizado como es el caso del *Thunnus alalunga* perteneciente a la familia *Scombridae*, considerada una especie con altos niveles de histamina (Iriarte & Torres, 2013). Según la FDA, un pescado es seguro cuando su contenido de histamina se encuentra por debajo de 50ppm. (Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, 2011).

Se desarrolló este estudio en la especie de atún, *Thunnus alalunga* conocida comúnmente como ¨albacora¨, en el mercado municipal ¨10 de Agosto¨ de la ciudad de Cuenca, con la finalidad de analizar los niveles de concentración de esta amina biógena, debido a que, en este mercado municipal, las condiciones de almacenamiento y distribución de este producto no son las adecuadas.

MARCO TEÓRICO

1.1 Aminas Biógenas

1.1.1 Definición

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de aminoácidos, los precursores de las aminas biógenas se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Aminas biógenas.

AMINAS BIÓGENAS		
Amina	**Aminoácido precursor**	**Clasificación**
Histamina	Histidina	Heterocíclica, primaria, mono amina
Tiramina	Tirosina	Aromática, primaria, monoamina
Feniletilamina	Fenilalanina	Aromática, primaria, monoamina
Triptamina	Triptófano	Heterocíclica, primaria, monoamina
Putrescina	Ornitina, arginina	Alifática, primaria, diamina
Cadaverina	Lisina	Alifática, primaria, diamina

Fuente: Maijala & col., 2003.

1.1.2 Clasificación

Atendiendo a su estructura química se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermita, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterociclicas (histamina, triptamina) y en función del número de grupo aminos de la molécula, podemos mencionar las monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermidina) (Rivas & Carrascosa, 2010)

Se clasifican de acuerdo al lugar donde se elaboren, es decir, pueden ser elaboradas en el organismo (endógenas) o encontrarse en los alimentos que se ingiere (exógenas), elaboradas por las células de éste o durante su procesamiento o su almacenamiento (Tapia, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, 2000).

1.1.2.1 Aminas biógenas endógenas

Son moléculas con funciones fisiológicas esenciales para los seres vivos, este tipo de aminas son formadas durante los procesos metabólicos normales de las células vivas,

a partir de la degradación de proteínas o aminoácidos, se producen en diferentes tejidos y desempeñan diversas e importantes funciones, están implicadas en procesos tan relevantes como la división celular o la transmisión nerviosa. Así, por ejemplo, la histamina actúa como neurotransmisor y la tiramina es un intermediario de las rutas de biosíntesis de otros neurotransmisores (Tapia, 2000).

1.1.2.2 Aminas biógenas exógenas

Las aminas biógenas, exógenas se forman en los alimentos principalmente al eliminarse el grupo carboxilo –COOH ("descarboxilación") de sus aminoácidos, por acción de las enzimas propias de sus tejidos o de los microorganismos que los contaminan. Algunos alimentos frescos pueden contenerlas en niveles bajos, los que pueden incrementarse durante procesos como la fermentación, el almacenamiento y la descomposición del alimento (Cid, 2011).

Entre los factores que influyen en este incremento están la contaminación microbiana, temperatura, pH, concentración de sales, etc. La ingestión de estos alimentos puede provocar la presencia de concentraciones altas de estas sustancias en el organismo de forma que tras su ingestión pasan a la circulación sanguínea desde donde ejercen diversos efectos tóxicos producir síntomas de toxicidad, como se puede apreciar en la tabla 2, por lo que son un índice del grado de frescura y seguridad del alimento. (Shalaby, 2006).

Tabla 2. Aminas biógenas y sus efectos farmacológicos.

AMINAS BIÓGENAS Y SUS EFECTOS	
Aminas Biógenas	**Efectos Tóxicos**
Histamina	Síntesis de Noradrenalina y Adrenalina, palpitaciones, vómitos y nauseas
Tiramina	Hipertensión, migrañas, vasoconstricción, lagrimación y salivación
Putrescina y Cadaverina	Rigidez mandibular, Bradicardia, hipotensión, Potencia el efecto de otras aminas
Triptamina	Hipertensión

Fuente: Shalaby, 2006.

1.1.3 Intoxicaciones alimentaria causadas por aminas biógenas

Las intoxicaciones alimentarias más frecuentes están relacionadas con la histamina y la tiramina. La intoxicación por histamina es la más conocida, existiendo referencias desde finales del siglo XIX sobre la incidencia de esta enfermedad, conocida como enfermedad de escombroide debido a que los trastornos se presentaban tras la ingesta de pescados del grupo Scombridae (Lyte, 2004). La intoxicación producida por tiramina se conoce también como reacción del queso, debido a los altos niveles que esta sustancia presenta en algunos quesos. Por otro lado, diaminas como putrescina y cadaverina pueden reaccionar con nitritos dando lugar a la formación de nitrosaminas de conocido efecto cancerígeno (Bover & Latoore, 2005).

1.1.4 Bacterias implicadas

La presencia de estas sustancias químicas en los alimentos se debe a la acción de microorganismos sobre las proteínas y más específicamente a las reacciones de descarboxilación de los aminoácidos llevadas a cabo por bacterias específicas. (Baraggi, Velázquez, & Castro, 2010). Por lo tanto, hay dos factores clave para su acumulación en los alimentos: la presencia de las bacterias con actividad aminoacil-descarboxilasa y la disponibilidad de los sustratos de la reacción (Nollet & Toldra, 2016).

Los microorganismos que se encuentran con mayor frecuencia son bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas como: *Citrobacter, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Micrococcus, Morganella, Vibrio* e incluso en bacterias ácido láctico (BAL) pertenecientes a los géneros *Lactobacillus, Enterococcus, Carnobacterium, Pediococcus y Lactococcus*. (Burdychová, 2007). En cuanto a los alimentos que presentan una mayor posibilidad de contener aminas biógenas, son aquellos que contienen una elevada carga de proteínas (Baraggi, Velázquez, & Castro, 2010). (Gozzi, Piacente, & Cruces, 2011).

1.2 Histamina

1.2.1 Definición

La histamina es una de las principales aminas elaboradas por nuestro organismo, se considera una hormona debido a que cumple funciones fisiológicas variadas, entre los cuales actúa regulando procesos alérgicos, inflamatorios, metabólicos y también como neurotransmisor (Izquierdo, Cespedes, & Camacho, 2008). Se encuentran en muchos

tejidos del cuerpo y, en pequeñas cantidades, en los alimentos que comúnmente se consume (Montes & Flores, 2005).

La histamina se forma a partir de la histidina, cuando se pierde su grupo carboxilo ("descarboxilación") por acción de una enzima (L-histidina descarboxilasa), como se describe en la figura 1 (Cervantes, 2009). Los mastocitos y basófilos son por excelencia los sitios en los que predomina el almacenamiento de la histamina; dichas células se encuentran en altas concentraciones en la piel y las mucosas. (Montes & Flores, 2005). También están en alimentos como pescado, quesos, vinos o embutidos, inclusive puede encontrarse en conservas porque resiste el calor de la esterilización y es un indicador de inadecuadas condiciones higiénicas en su elaboración o el uso de materia prima en malas condiciones (May, 2008).

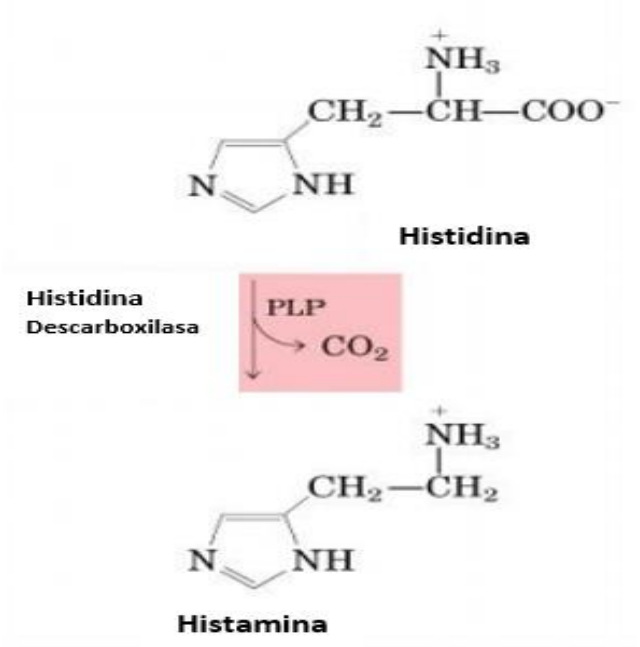


Figura 1. Estructura química de la histamina. Fuente (Cervantes, 2009).

1.2.2 Efectos de la Histamina en el organismo

Para producir sus efectos específicos en el organismo, la histamina se une a los llamados "receptores" en diversas partes del cuerpo, estos receptores histamínicos son de cuatro tipos: H_1, H_2, H_3 y H_4. La histamina tiene un efecto diferente que depende del tipo de receptor con el que ha reaccionado (Gomez, 2003).

Los receptores H_1 son los más importantes (localizados en el músculo liso, el endotelio y tejidos del sistema nervioso central) producen vaso-dilatación, bronco-constricción, contracción del músculo liso, dolor y picazón. Los anti-histamínicos bloquean la unión

de la histamina con los receptores H_1 (Humberto, 2001). Los receptores H_2 (localizados en la mucosa del estómago) regulan la secreción de los ácidos gástricos y el aumento de secreción de moco en las vías respiratorias. Los receptores H_3 (localizados en el tejido del sistema nervioso central) regulan la liberación de histamina y de otros neurotransmisores (acetilcolina, norepinefrina y serotonina) (Aquino, Molina, & Arias, 2012). Los receptores H_4 (localizados principalmente en el timo, intestino delgado, bazo y colon), cuya función no se ha esclarecido a cabalidad (Medina, Croci, & Crescenti, 2010).

La histamina también es conocida como “escombrotoxina” porque es asociada con intoxicaciones por consumo de pescado, especialmente de la familia de los *Scombridae* (caballa, atún) en mal estado (Fundacion Vasca para la seguridad Agroalimentaria, 2013). El tejido muscular del pescado, sobre todo cuando empieza a deteriorarse, libera histidina, la que puede transformarse en histamina por las enzimas presentes y por acción de algunas bacterias, que crecen muy lentamente a baja temperatura (cerca a los 0ºC), pero lo hacen muy rápidamente cuando ella aumenta. Por ello, la cadena de frío debe mantenerse permanentemente (Gómez Castro, 2014).

Los síntomas más frecuentes de la intoxicación son ligera hipotensión arterial, picor, enrojecimiento y dolor de cabeza; estos síntomas suelen aparecer antes de las 3 horas de la ingestión (Maintz & Novack, 2007). En casos graves puede producirse diarrea, calambres, náuseas, espasmos bronquiales y trastornos respiratorios. Estos efectos son potenciados por otras sustancias (como putrescina, cadaverina y espermina) que también se liberan en estas condiciones. (Diaz & Cruces, 2011)

Actualmente existen métodos confiables, rápidos y seguros para determinar la cantidad de histamina de un alimento (Gomez, 2003). Los niveles permitidos en los productos pesqueros varían: para la Comunidad Europea es de 100 ppm (partes por millón) pero para la Food and Drug Administration (FDA) es de 50 ppm (Lehane L. , 2000).

1.3. Escombroidosis

1.3.1 Definición

La escombroidiosis es una intoxicación de tipo química ocasionada por la histamina y causada por la ingestión de alimentos entre ellos los pescados ya sean de la familia *Scombridae* o no, pero con altos contenidos de histidina, los cuales no fueron tratados con óptimas condiciones de conservación e higiene, el pescado fresco contiene cerca de 1mg/100g de histamina y los peces afectados contienen cerca de 20mg/100g de

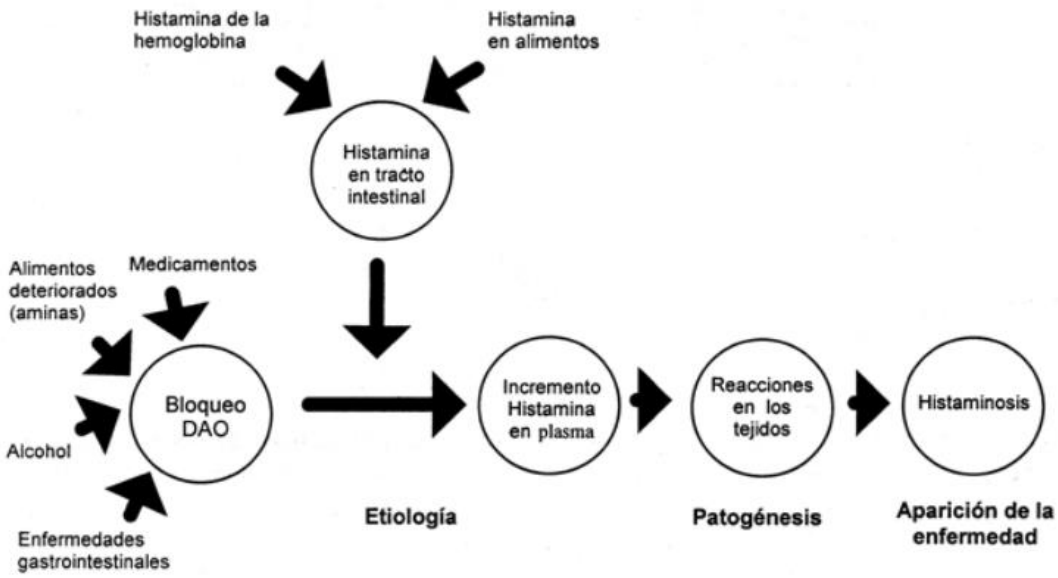
histamina llegándose a encontrar en algunos casos de hasta casi 400mg/100g de histamina (Müller GJ, 2016).

La intoxicación se produce por la ingesta de alimentos que contengan niveles altos de histamina (Cervantes, 2009), aminas y compuestos vasoactivos o niveles normales de L-histidina pero que no hayan tenido una correcta conservación post-morten. La histamina se forma por la proliferación de bacterias tales como *Vibrio spp, Clostridium spp, Lactobacillus spp, Salmonella spp, Klebsiella, Pneumoniae, Proteus*, entre otros (CK Murray, 2015).

1.3.2 Características de la intoxicación

En condiciones no adecuadas de conservación los peces de carne oscura sufren descomposición bacteriana llevando a descarboxilación de aminoácido L-histidina originando la formación de histamina, explicando así su fisiopatología tal como se indica en la figura 2.

Figura 2. Concepto de la enfermedad de la histaminosis inducida por los alimentos.



Fuente (Gonzales, 2008).

La histamina es resistente al calor por lo que no se destruye con la cocción doméstica o comercial sin embargo la formación de histamina se detiene con la refrigeración a 0º C. El pescado afectado puede tener sabor metálico o picante pero su aspecto y textura pueden ser normales (Cruickshank, 2010).

1.3.3 Manifestaciones Clínicas

Los síntomas de la intoxicación por histamina son principalmente neurológicos y cutáneos ejerciendo acción sobre el aparato cardiovascular, glándulas endócrinas y músculo liso (Lehane L. , 2000). Las manifestaciones suelen darse 5 minutos después de la ingesta o puede tardar varias horas en manifestarse, todo esto depende de las concentraciones de histamina y aminas que se encuentren en el pescado (Taylor, 2010).

- Cutáneos: Erupciones, urticaria, inflamación localizada, eritema.
- Digestivos: Náuseas, vómito, diarrea, dolor epigástrico, cólicos.
- Circulatorios: Hipotensión o hipertensión, edema, taquicardia, palpitación e inyección conjuntival.
- Neurológicos: Cefalea, hormigueo, calambres, sensación de calor, pérdida de visión.
- Respiratorios: Bronco constricción, dificultad respiratoria (Galvez & Domínguez, 2015).

1.3.4 Diagnóstico

El diagnóstico es clínico mediante una correcta anamnesis al paciente. Sin embargo, es posible establecer un diagnóstico etiológico mediante la cuantificación de los niveles de histamina en sangre, y en orina y en el propio alimento ingerido, pudiendo hablarse de escombroidiosis cuando aparezcan más de 100 mg de histamina en cada 100g de pescado, o más de 2-4 veces los niveles normales en orina (American Medical Association, 2004).

1.3.5 Tratamiento

Se recomienda el tratamiento con medicamentos antihistamínicos, y la terapia de rehidratación (oral o intravenosa) también puede ser necesaria. Fundamentalmente se usan antihistamínicos, tanto antiH1 como antiH2, puesto que ambos tipos de receptores se encuentran a nivel de los vasos del organismo. (Pardo, 2004). En casos de shock, es necesaria una expansión adecuada del volumen plasmático e incluso el uso de soporte con aminas vaso activas (Mena, 2007).

1.3.6 Prevención

El riesgo de padecer una intoxicación por histamina lo tiene cualquier persona, no sólo aquellas que se alimenten de peces de zonas cálidas y templadas (Carbajal, 2010). Los niveles de histamina nocivos para el hombre varían, según la comunidad Europea son

100mg/100g de histamina en el pescado y según la FDA son 50mg/100g de histamina en el pescado lo que es dañino para el ser humano (Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, 2011).Lo que es claro cualquier porcentaje de histamina superior al que contienen normalmente los peces ya causa alteraciones en los consumidores (Lehane L. , 2000).

Para esto existen ciertas medidas que se deben tener en cuenta:

• Mantener los pescados a temperaturas por debajo de los 5°C

• Evitar el consumo de clases de pescado potencialmente peligrosos que no hayan recibido tratamientos adecuados.

• Manipular de forma higiénica los alimentos, especialmente las conservas si van a ser consumidas varias horas fuera del envase.

• Envasar adecuadamente los bocadillos o los productos elaborados con conservas, e intentar mantener frío (M.A, 2003).

1.4*. Thunnus alalunga.*

1.4.1 Generalidades

El atún aleta amarilla (Thunnus *alalunga*), denominada comúnmente como albacora, es una especie epipelágica altamente migratoria de la familia Scombridae, que habita capas oceánicas relativamente superficiales (0-100 m), clasificación descrita en la tabla 3. Se distribuyen desde los 32° 43’ norte hasta los 37° 00’ sur, estando restringidos por la isoterma de 28°C. Se mueven periódicamente por todo el océano dependiendo de la edad (juveniles y adultos). (Saithon, 2008).

Tabla 3. Clasificación Taxonómica de T. alalunga.

Clasificación Taxonómica de la especie T. alalunga	
Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Clase:	Actinopterygii
Orden:	Perciformes
Familia:	Scombridae
Género:	Thunnus
Especie:	T. alalunga

Fuente (Bonnaterre, 1788)

Cerca de las costas se pueden observar ejemplares juveniles y organismos adultos en aguas más oceánicas. Los ejemplares de hasta 50 cm permanecen en las zonas costeras, presentando hábitos migratorios moderados (30 millas) (Velasquez, 2014). Algunos juveniles migran hacia el oeste y siguen movimientos estacionales tróficos. Los pre-adultos migran a latitudes más altas y también siguen migraciones cíclicas. Los adultos realizan migraciones transoceánicas y latitudes altas (Pacheco, Romero, & Peralta, 2015).

En la década de los setenta la albacora se distribuyó cerca de las costas ecuatorianas, pero en la década de los ochenta su distribución fue registrada lejos de éstas costas, obligando al uso de dispositivos agrupadores de peces (Pacheco J. , 2013). En la década de los noventa, se generaliza el uso de objetos flotantes por la distribución oceánica del recurso. En el 2000 se adoptó procedimientos sobre el uso de objetos flotantes o plantados con el fin de capturar a esta especie para su comercialización (Velasquez, 2014).

1.4.2 Descripción

Esta especie posee características variadas, entre las cuales se puede mencionar, su forma alargada hidrodinámica, con unos 140 cm de longitud. Además, posee aletas largadas pectorales, entre 25 y 35 branquispinas, dos aletas dorsales, la primera con 12 - 14 radios espinosos y la segunda con 3 espinosos solamente seguidos de 7 - 9 pínnulas; aleta anal con 3 espinosos, 11 - 13 blandos y tras estos 7 u 8 pínnulas. El dorso es de color azul oscuro y el vientre plateado. Las aletas dorsales amarillas, las anales blanquecinas, ambas con margen negro. Extremo de la aleta caudal blanco, como se refleja en la figura 3 (Les, Gallagher.2008).

Figura 3. Especie *Thunnus alalunga*. Fuente (Les, Gallagher, 2008).

1.4.3 Distribución y comercialización en el Ecuador

En el Golfo de Guayaquil esta especie se encuentra distribuida en la estación húmeda, en los meses de enero, febrero, marzo y abril. Las condiciones que permiten la presencia de larvas de atún, corresponden a temperaturas superficiales superiores a 24°C a 26°C, coincidentemente con la temperatura registradas en aguas costeras continentales en este período, mientras que en la estación seca se distribuye al oeste de la Isla Isabela durante los meses de junio a septiembre (Hernández & Rios-Lugo, 2009).

De acuerdo con el estudio del MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca), del año 2014, Ecuador capturó en el OPO (Océano Pacífico Oriental), 230.700 toneladas métricas de atún, para lo cual, según las estadísticas de la CIAT (Comisión Internacional del Atún tropical), el 65% se destina a la exportación, alrededor del 30% para consumo nacional, y finalmente un 15% para el proceso de industrialización (Ministerio de Agricultura, Ganaderia, Acuacultura y Pesca , 2015).

En cuanto al consumo de atún fresco (lo que se compra en las pescaderías), el bajo volumen y la dificultad del consumidor para identificar las especies, no permite un análisis de grupos de consumidores donde se distingan las especies (Borodulima, 2016) (Villa, 2015).

METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS

2.1. Tipo de estudio.

El estudio de este trabajo fue de tipo descriptivo observacional.

2.2. Localización del estudio.

El desarrollo del proyecto de investigación, se llevó a cabo en el mercado “10 de Agosto” de la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay. En donde se realizó la toma de las muestras, las cuales fueron transportadas para su análisis al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de Cuenca.

2.3. Muestreo

Se realizó un muestreo representativo aleatorio no probabilístico, por conveniencia. Este muestreo fue utilizado porque las condiciones de la población a muestrear no permiten tener acceso a todas las unidades que están presentes en el mercado. Otra razón para establecer el muestreo por conveniencia está en que el número de pocillos para el análisis que brinda el kit es de 142

Para el plan de muestreo se estableció que en cada uno de los puestos se tomen 3 unidades diarias, por dos días a la semana (lunes y miércoles) durante las 4 semanas de estudio. La totalidad de muestras por puesto fueron de 24 unidades. Trabajando con una población total de 192 muestras, las cuales fueron analizadas por duplicado. El cronograma de muestreo en cada uno de los puestos se indica en la tabla 4.

Tabla 4.- Cronograma de muestreo durante el mes de recolección de muestras.

Puesto	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	Unidades a muestrear		Unidades a muestrear		Unidades a muestrear		Unidades a muestrear	
	Día1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
N°1	3	3	3	3	3	3	3	3
N°2	3	3	3	3	3	3	3	3
N°3	3	3	3	3	3	3	3	3
N°4	3	3	3	3	3	3	3	3
N°5	3	3	3	3	3	3	3	3
N°6	3	3	3	3	3	3	3	3
N°7	3	3	3	3	3	3	3	3
N°8	3	3	3	3	3	3	3	3
Total	192 muestras							

2.4. Toma de muestra.

Para la toma de la muestra se debe considerar en la unidad a muestrear que el corte sea prominente en masa muscular, específicamente del lomo del pescado, se toma aproximadamente 200 g. por cada pescado, el corte se guardó en un recipiente estéril debidamente etiquetado, con el número de puesto de recolección y la fecha respectiva.

Las muestras procedentes en el lapso del mes de estudio, se realizaron en 2 días de selección por cada semana, elegidos de acuerdo al arribo del pescado sujeto de análisis, a los puestos de expendio, las cuales fueron transportadas en cooler con hielo, con una temperatura aproximada de 4°C. Cada unidad muestreada se etiquetó convenientemente de acuerdo a cada uno de los puestos de muestreo, para su posterior análisis en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. **(Anexo 1)**

La toma de muestra realizado en este proyecto de investigación, está contemplado en el reglamento de la FDA, en el artículo "*Fish and Fishery products. Hazard and Controls Guidance*", este hace referencia a todo producto derivado y cuya procedencia sea del mar, que esté destinado para el consumo humano e indica que las muestras deben ser

tomadas directamente del lugar de expendio considerando la especie y su utilidad en el consumo diario del hombre. **(Anexo 2).**

2.5 Fundamento del método de análisis.

La determinación de histamina se realizó a través del método de ELISA, por medio del kit VERATOX®, el cual está especialmente diseñado para realizar un análisis de tipo cuantitativo de valores de histamina presentes en diferentes especies de pescado azul y en harinas de pescado.

Se trata de un inmunoensayo de tipo ELISA competitivo directo, que según Cultek ELISA es una técnica que se basa en el uso de un antígeno o un anticuerpo marcado con una enzima; al estar uno estos componentes marcado y fijado a un soporte, se interrumpe la reacción antígeno-anticuerpo, posteriormente se le agrega un sustrato específico sobre la enzima que producirá un color determinado observable a simple vista o cuantificable por un espectrofotómetro, como el método es directo este fija el antígeno al soporte, se lava para eliminar los no fijados, luego se adicionan los anticuerpos marcados con la enzima para que reaccione con el antígeno y que solubilizado el complejo, se lava para eliminar anticuerpos que no reaccionaron y se agrega un sustrato específico para la enzima, al final se observa la coloración. Con un rango de cuantificación establecido de 2,5 a 50 ppm, en un tiempo estimado de análisis de 10 a 20 minutos. La extracción de la histamina para su posterior valoración, se realiza por medio de un sistema de diluciones, que utiliza agua destilada desmineralizada, buffer de lavado, sustratos, provistos por el kit. **(Anexo 3).**

2.6 Procedimiento del análisis.

Este procedimiento se realizó de acuerdo a la técnica del kit VERATOX® histamina. **(Anexo 3)**

2.6.1 Extracción de la muestra

- Mezclar 10g de muestra más 90 ml de agua destilada desmineralizada en un recipiente pudiendo ser este de vidrio o de plástico.
- Agitar vigorosamente de 10 a 20 segundos, puede utilizarse un homogeneizador o una trituradora, con la finalidad de obtener una mezcla homogénea.
- Dejar reposar el extracto durante 5 minutos.
- Volver a homogenizar la muestra durante 15 a 20 segundos.
- Dejar sedimentar el extracto durante 30 segundos.

- Filtrar el contenido del homogenizado, utilizando papel filtro, pasando el filtrado a un nuevo recipiente.

2.6.2 Preparación de la dilución del extracto

- Mezclar 100ul del filtrado proveniente del extracto homogenizado, con 10 ml del buffer diluyente en un tubo de ensayo o de análisis.
- Llevar el tubo al homogeneizador, o agitar suavemente.

2.6.3 Preparación de la muestra para la lectura, con el kit VERATOX®.

- Sacar los reactivos del lugar de almacenaje a temperatura de refrigeración, y dejarlos a temperatura ambiente, previamente homogenizados.
- Tomar los micros pocillos rojos, en el número de muestras que vayan a ser analizadas, más cinco pocillos extra para los patrones. Se toma el mismo número de pocillos transparentes que tienen impregnados el anticuerpo.
- Colocar 100ul de conjugado en cada uno de los pocillos rojos.
- Añadir 100ul de cada disolución patrón en los 5 pocillos extra de rojo.
- Con pipeta automática mezclamos el contenido de los pocillos rojos, pipeteando el líquido de arriba hacia abajo por tres veces.
- Trasvasar 100ul de la mezcla de los pocillos rojos, a los pocillos transparentes impregnados de anticuerpos. Y se descartan los pocillos rojos.
- Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Luego de transcurridos los 10 minutos desechar el líquido de los pocillos.
- Lavar cuidadosamente cada pocillo con solución buffer de lavado, por tres veces consecutivas, desechando el líquido de cada lavado.
- Golpear los pocillos sobre una hoja de papel absorbente, para eliminar el exceso de líquido de la solución buffer de lavado.
- Añadir 100ul de la solución substrato a cada pocillo con pipeta automática.
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar 100ul de la solución stop en cada pocillo, para detener la reacción.
- Leer las muestras en un equipo de lectura para ELISA a un filtro de 650nm.

2.7. Curva de calibración.

Para elaborar la curva de calibración se realiza una lectura de los controles en cada uno de los pocillos de lectura, por medio de esta lectura se obtienen densidades ópticas de los controles, con las que el equipo traza la curva típica, éstas en la gráfica realizan una contra curva, calculando así la concentración exacta de histamina.

2.8 Sensibilidad de la técnica

La técnica muestra una relación inversamente proporcional entre la cantidad de histamina con la coloración que marca el reactivo, es importante dejar en claro que el Kit VERATOX® no determina directamente la concentración de histamina, sino que realiza en conjunto con el equipo una lectura en unidades ópticas que, utilizando una regresión de la curva obtenida, pueden ser transformadas esas unidades a partes por millón. Las unidades ópticas son determinadas por medio de las lecturas obtenidas de cada una de las soluciones patrones siendo estas de 0; 2,5; 10; 20; 50 ppm. El kit tolera como máximo valor aceptable el de 50ppm, todas las muestras que superen este valor deberán ser reportadas como histamina positiva. El kit VERATOX® establece un valor relativo “r” que ayuda a determinar el grado en el cual el modelo se ajusta a las lecturas de absorbancia obtenidas por el equipo. El valor proporcionado debe ser mayor a 0,98 para que el análisis sea considerado válido.

2.9. Análisis estadístico.

El análisis estadístico que fue empleado para este trabajo fue de tipo descriptivo de variables. Representados por medio de gráficas de control, histogramas, diagramas con cuadros comparativos y gráficos de barras.

Para analizar las diferencias de niveles de histamina entre los diferentes puestos de expendio en el mercado de estudio, se realizó un análisis de varianza ANOVA que brinda factores comparativos de los niveles de histamina obtenidos, ya sea aplicado a valores de lectura directa en ppm, como en valores porcentuales. La probabilidad de diferencias estadísticas entre los valores refleja un nivel de confianza del 95%, el cual fue determinado a través del programa estadístico IBM SPSS Statistics V 22.0.

RESULTADOS

3.1. Curva de calibración.

3.1.1. Resultado de lecturas de absorbancia para la curva de calibración de las concentraciones estándares del kit VERATOX®.

Para el análisis de las muestras en el equipo de lectura ELISA, se realizó una curva de calibración, utilizando para ello 5 patrones de concentraciones 0; 2,5; 10; 20; 50 ppm bajo una longitud de onda de 650nm. Los resultados se pueden apreciar en la tabla 5.

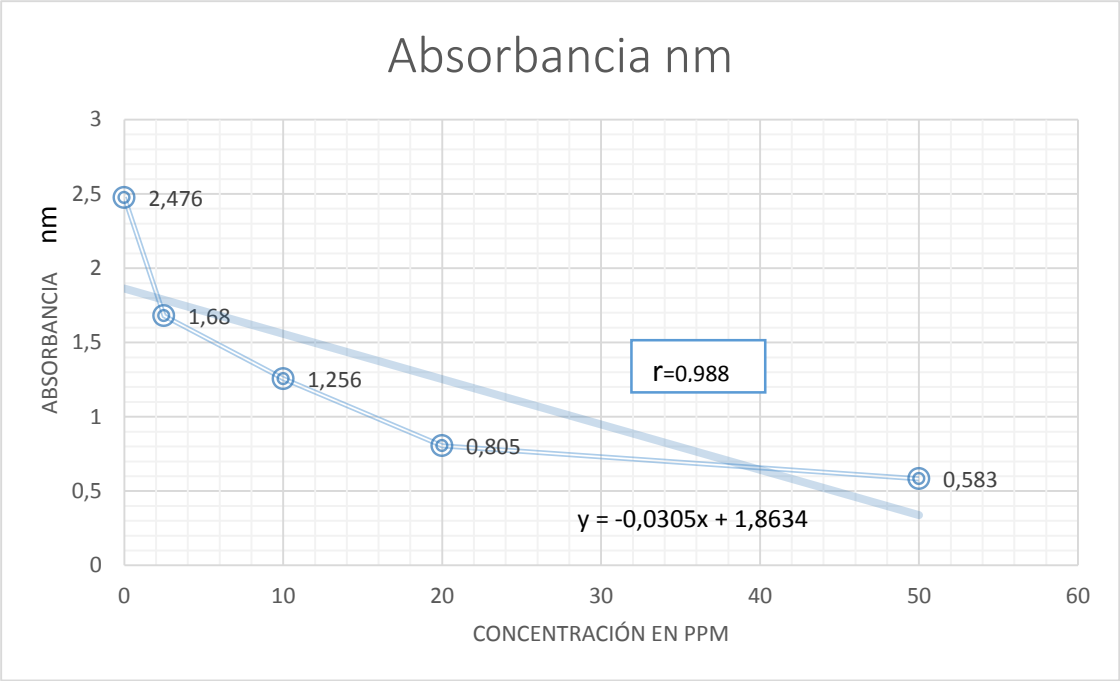
Tabla 5. Resultados promedio de absorbancia de las concentraciones de Histamina estándar del Kit VERATOX®.

Concentración estándar en ppm	Absorbancia nm (promedio)
0	2,476
2,5	1,680
10	1,256
20	0,805
50	0,583

Las lecturas fueron realizadas con las muestras patrón que se encuentra en el kit, los cuales marcan límites inferiores y superiores para las lecturas de las muestras de pescado, que serán previamente diluidas para sus lecturas.

3.1.2 Curva de calibración a una longitud de onda de 650nm.

Por medio del equipo STAT FAX REARDER 321, se obtuvo la curva de calibración mediante la lectura de las soluciones patrones provistos por el Kit VERATOX® de concentraciones conocidas con un coeficiente de correlación de 0,988 coeficiente obtenido con la lectura de las soluciones patrón provenientes del kit. Para la elaboración de la curva se utiliza el promedio de las lecturas de las concentraciones patrón, obtenidas de cada día, en que se realizó la lectura de las muestras. **(Anexo 4)**



Gráfica 1. Curva de calibración promedio, de los estándares bajo la lectura de 650nm

El gráfico obtenido es compatible al modelo de gráfica con escala semilogarítmica de base 10, se traduce en una recta de tendencia que posee regresión lineal, con coeficiente de correlación de 0,988, aceptando la curva de calibración. Podemos ver que en el análisis existe también un coeficiente de relación negativo cuyo valor es de -1, indicando la relación es inversa entre variables, mientras la concentración de histamina aumenta, la señal de absorbancia disminuye, que se puede apreciar en la gráfica 1.

3.2. Cálculo de máximos, mínimos y medianas de las concentraciones en ppm por cada semana de análisis.

Con los promedios obtenidos de las lecturas del total de muestras. **(Anexo 5).** Se calcularon los siguientes valores.

Tabla 6. Análisis descriptivo en ppm. de histamina por semana, bajo la totalidad de muestras analizadas.

	SEMANA 1		SEMANA 2		SEMANA 3		SEMANA 4	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Mínimo	18,33	17,70	23,41	19,56	24,01	22,46	17,33	14,43
Máximo	68,28	68,11	95,86	62,90	45,71	46,56	72,05	60,43
Mediana	32,40	32,28	35,33	34,80	35,02	29,73	34,10	34,08
Desviación estándar	17,71	18,38	23,48	15,18	8,49	6,88	17,28	13,48
Varianza	274,29	295,64	482,32	201,73	63,00	41,40	261,39	159,09

Los valores de medias, varianzas, mínimos, máximos, obtenidos de los estudios de datos de los ocho puestos de muestreo. Se puede observar como límite máximo 95,86 en la semana 2.

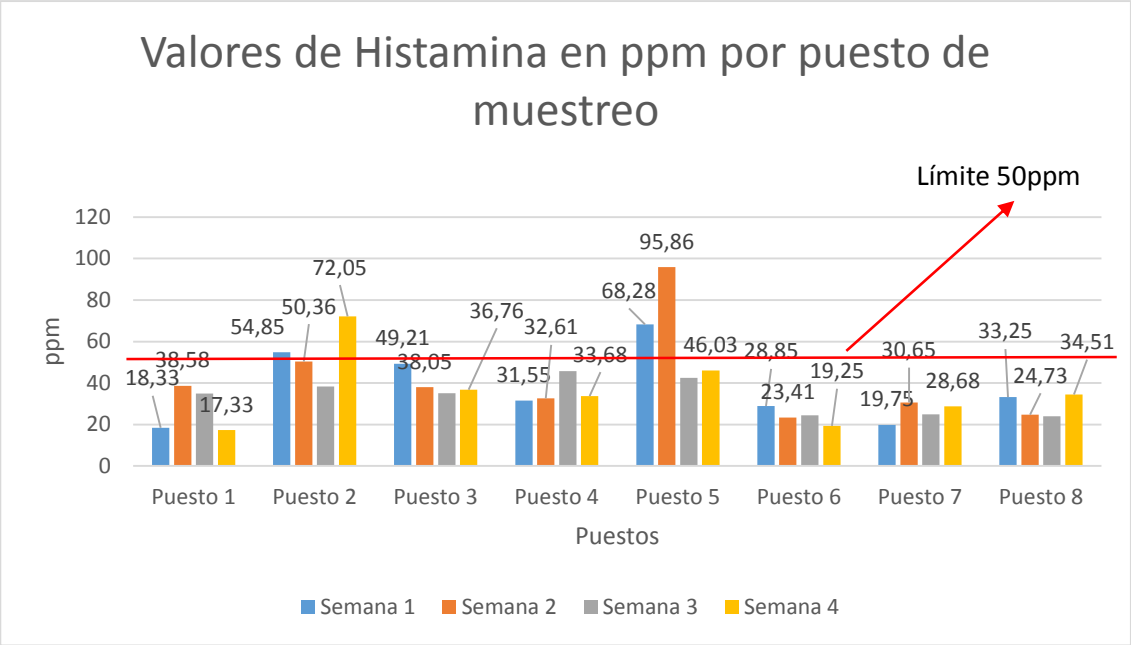
Podemos apreciar que la varianza en cada una de las distintas semanas, marca una diferencia entre cada uno de los días que se realizó la toma de la muestra.

3.3. Gráficas representativas de concentraciones en ppm de histamina.

Con respecto a la totalidad de muestras analizadas, y los valores expuestos anteriormente en cada una de las tablas registradas, se realizarán gráficas representativas de barras, los cuales dan una representación global de cada uno de los valores obtenidos de histamina en cada uno de los puestos del mercado, durante las 4 semanas de muestreo.

SEMANA DE LA 1 A LA 4

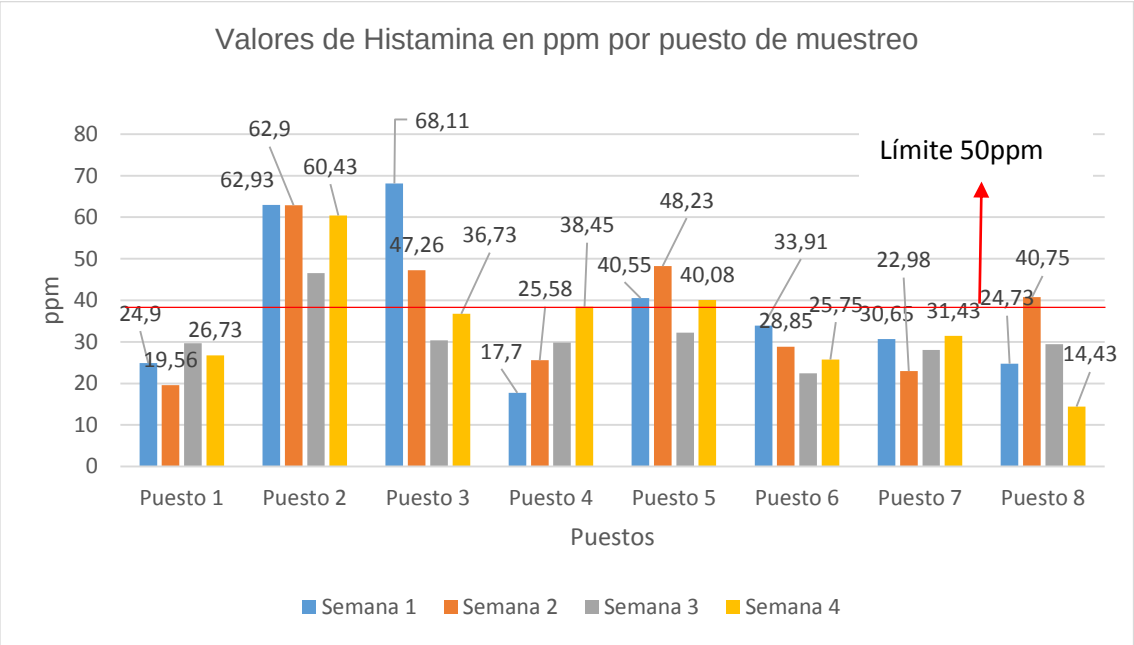
DIA 1



Gráfica 2. Valores de histamina en puestos de muestreo en ppm. día 1

SEMANA DE LA 1 A LA 4

DÍA 2



Gráfica 3. Valores de histamina en puestos de muestreo en ppm. día 2

En la gráfica 2 y 3 se pueden observar que el mayor porcentaje de histamina está en el puesto número 3 en el día 2 de toma de muestra y en el puesto 5 en el día uno. Se

podría considerar los puestos del día 2, como valores que se desprenden del límite normal, con porcentajes altos de presencia de histamina en sus muestras.

3.4. Valores de histamina promedio en ppm por cada puesto.

Los valores promedio en ppm de histamina, se elaboraron a partir del total de muestras analizadas por cada puesto como se pueden observar en el anexo 4.

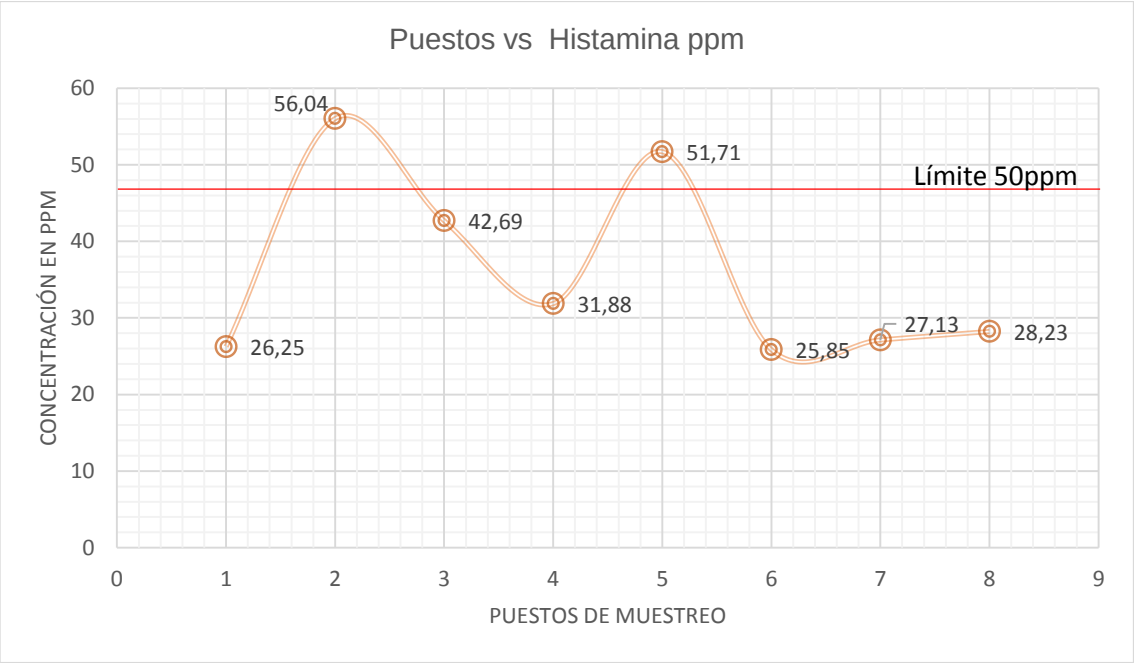
Tabla 7. Valores en ppm por cada puesto de muestreo, bajo la totalidad de muestras analizadas.

PUESTO DE MUESTREO	**Totalidad de muestras analizadas. Durante las 4 semanas de muestreo.**	
	Número de unidades	Concentración promedio de histamina ppm.
Puesto N° 1	24	26,25
Puesto N° 2	24	56,04
Puesto N° 3	24	42,69
Puesto N° 4	24	31,88
Puesto N° 5	24	51,71
Puesto N° 6	24	25,85
Puesto N° 7	24	27,13
Puesto N° 8	24	28,23
Total	192	36,22

Los datos obtenidos de la tabla 8 son el promedio de las lecturas de las 24 muestras obtenidas durante el análisis, claramente los puestos 2 y 5 indican un promedio superior a los valores límite de 50ppm.

3.5. Gráfica de concentraciones de histamina en ppm, por cada puesto de muestreo.

Refiriéndonos al interés del estudio, la siguiente gráfica 4 nos muestra un análisis de dispersión con las concentraciones en ppm de histamina en promedio de los 8 puestos de venta de “albacora” *Thunnus alalunga*.



Gráfica 4. Dispersión de histamina en ppm, por cada puesto de muestreo.

Durante las 4 semanas de estudio bajo la totalidad de muestras analizadas, el puesto número 2 es el que presenta en promedio mayor valor de histamina en sus unidades muestreadas seguido del puesto número 5. Los otros valores se encuentran bajo el límite de referencia, los valores se pueden apreciar en el gráfico 4.

3.6. Estadística descriptiva de los valores por cada puesto de muestreo.

Se llevó a cabo el análisis de cada uno de los puestos de muestreo, con cálculos de los parámetros.

Tabla 8. Análisis de concentraciones promedio de histamina en ppm por cada puesto de muestreo, bajo la totalidad de muestras analizadas.

Puesto de muestreo	Mínimo	Máximo	Mediana	Desviación Estándar.	Varianza	Muestras analizadas superiores a 50 ppm.
Puesto N° 1	17,33	38,58	25,82	7,82	53,57	0
Puesto N° 2	38,26	**72,05**	57,64	10,76	101,23	**54**
Puesto N° 3	30,36	68,11	37,41	12,02	126,47	37
Puesto N° 4	17,70	45,71	32,08	8,31	60,42	4
Puesto N° 5	32,20	**95,86**	44,24	20,68	374,29	**50**
Puesto N° 6	19,25	33,91	25,07	4,57	18,27	0
Puesto N° 7	19,75	31,43	28,37	4,20	15,42	0
Puesto N° 8	14,43	40,75	27,08	8,07	56,95	0
Total de muestras	192					18,12%

En la tabla 8 se indican los resultados correspondientes al análisis estadístico, el puesto 5 marca el máximo con un 95,86ppm. Los puestos número 2 y 3 presentan valores que pueden considerarse importantes para el análisis. También en el puesto número 2 existen un 54% de presencia de histamina en sus muestras, es decir más de la mitad de muestras analizadas presentan niveles de histamina que superan el límite permitido. El puesto número 5 marca que el 50% de sus muestras muestran presencia de histamina que podría ser perjudicial para el consumidor.

3.7. Análisis ANOVA.

El análisis ANOVA de un factor, aplicado a los valores obtenidos de histamina en ppm, de los 8 puestos de venta del pescado.

Tabla 9. ANOVA de un factor. Comparación de valores de histamina en ppm, de los 8 puestos de venta.

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	597,5580	1	597,558025	7,991	0,0134	4,60010
Dentro de los grupos	1046,874	14	74,77678214			
Total	1644,432	15				

El valor de probabilidad F es de 0,0134 siendo inferior al 0,05 que equivale al 5% de error del análisis, se considera que los grupos poblacionales, no mantienen un promedio entre ellos, es decir se notan claras diferencias en los valores de cada uno de los conjuntos de datos tomados para el análisis. Este valor nos indica una fiabilidad del estudio del 95%, trabajando con grupos heterogéneos de valores. El valor de F obtenido para el estudio, indica que en la determinación de histamina en ppm de cada uno de los ocho puestos de muestreo no se notan valores homogéneos, sino que hay una diferencia significativa entre los valores de un puesto a otro.

DISCUSIÓN

Los efectos adversos por la ingesta de altas dosis de histamina, según la FDA, el nivel de histamina es de 50mg/1000g (Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, 2011). El análisis de los datos de este estudio, está encaminado a determinar los niveles de histamina que superan los parámetros establecidos, para cada uno de los puntos de venta, o puestos de muestreo.

Los efectos que causa la histamina en la salud son muy considerados, desde el punto de vista de las intoxicaciones por productos derivados del mar, es por esto que Field y Calderón (2008) indican que los porcentajes de histamina que presenten los peces, así no superen los valores críticos, pueden causar alteraciones en la fisiología constante del hombre que haya ingerido el pescado con dicha carga de histamina en él.

Se pudo determinar que en el mercado “10 de Agosto” de la ciudad de Cuenca, 3 puestos de los 8 analizados presentan gran número de muestras con altas concentraciones de histamina, estos valores fueron evidentes y reincidentes durante cada análisis a los que se sometía.

En la especie *Thunnus alalunga* la cual se analizó en este trabajo los niveles de histamina, incumple en 3 puestos. Hay que recalcar que para que la histidina se transforme en histamina tiene que estar en estado libre. La cantidad de histamina presente en el pescado, es directamente proporcional a la cantidad de histidina presente en él según Cruces y Díaz (2011), no se puede despreciar bajo ningún término la carga bacteriana (familia *Enterobacteriaceae)* que posea el pescado posterior a su captura. La influencia de las malas prácticas de manipulación durante la fase de expendio al público, originan el aumento de la carga bacteriana en el pescado, posterior estas elevadas cargas aportarán con altos contenidos de enzima amino descarboxilasa, aumentando la transformación de histidina a histamina, generando altas concentraciones de histamina en el pescado de venta.

En los promedios obtenidos de las lecturas de histamina por cada uno de los puestos de muestreo durante las 4 semanas de estudio, las cifras altas corresponden al puesto número 2, 3 y 5, en estos puestos de expendio se podía evidenciar claramente la falta de refrigeración o bajas temperaturas de almacenamiento de los pescados, que se exhibían para la venta, al estar a altas temperaturas ambientales, y tiempos de exposición prolongados, el crecimiento de bacterias productoras de histamina tenía las condiciones ideales para proliferar. La producción o la formación de histamina a partir de su precursor químico la histidina es inducida por el abuso de temperaturas

posteriores a la captura del pescado, ya que los niveles perjudiciales para el consumidor resultan apreciables en pescados en donde la combinación de una mala temperatura de almacenaje y tiempo prolongado ocasionan el aumento de los niveles de histamina. Un control de temperatura, el pescado debe estar a una temperatura que según Fernández (2002), en su investigación "Control de la producción de histamina durante el deterioro del pescado", demuestra que la temperatura interna del pescado en el almacenamiento no debe superar los 10°C, durante las primeras 6 horas después de haber sido el pez sacado de su hábitat natural, marcando como temperatura ideal 4°C, así garantizaría que la concentración de histamina se redujera considerablemente.

Es primordial impedir la formación de histamina en el pescado posterior a su captura, para ello el mecanismo a utilizar es su rápido enfriamiento y mantenerlo así durante su transporte y su almacenamiento previo a la venta, lo resalta Gozzi, Picente (2011). Hay que tomar en cuenta que así se controlen el tiempo de transporte del pescado desde los puertos de distribución ubicados en Puerto Bolívar y Salinas al mercado "10 de Agosto", que supera el promedio de 4 horas de transporte, a eso se debe sumar el tiempo que tarda el pescado en ser vendido al consumidor y recordar que la temperatura ambiente en un promedio anual de 2016 de Cuenca es de 14,7°C según Cuenca Climate-Date.org, estas son condiciones que crean un deterioro del pescado en los lugares de venta. Esto tiene mucha lógica con el tema de investigación y los datos expuestos en los cuadros de análisis, en donde ciertos locales muestran valores de histamina fuera de los límites, en las 4 semanas del estudio, así se puede distinguir que los valores de las muestras de histamina que superan los valores permitidos, se encuentran en cada semana de análisis, sin excepciones, permitiendo decir que los parámetros de transporte juegan un papel primordial en el deterioro del pescado.

Se menciona que los efectos de la ingesta de albacora y productos pesqueros con altas concentraciones de histamina provocan patologías denominadas escombroidiosis que tienen relación directa con las enfermedades producidas por alimentos ETA, por eso es de suma importancia mantener un control previo de los niveles de histamina presentes en los productos de mar que están listos para el expendio. Así se observó que en el trabajo de titulación de maestría "Determinación de histamina en pescado fresco" (2016), en el análisis de 7 especies de pescados, la albacora presenta los niveles más altos de histamina de todo este grupo analizado. Este fue el argumento de mayor importancia, para que este estudio se enfoque únicamente en la determinación de los valores de histamina en la especie *Thunnus alalunga,* ya que este pescado es uno de los más consumidos por la población, en el plato típico conocido como "encebollado".

Así la determinación de los niveles de histamina nos ayudaría a tener un control del pescado previo a su expendio y posterior consumo.

Los niveles que sobrepasen los valores de 50ppm, no podrían ser captados por indicadores sensoriales de deterioro, pero si se debiera utilizar uno de ellos, el color rojo claro, sería un indicativo de que la carne está libre de contaminación bacteriana, o su carga no es la ideal para que produzca un aumento exagerado en la producción de histamina. Este deterioro puede darse a que el pescado luego de su muerte anula todos sus mecanismos naturales de defensa y hay resistencia nula a la formación de histamina por acción directa de las enzimas bacterianas. Por esto sería de suma importancia que todas las unidades sean analizadas y las cuales hayan sobrepasado los valores límites establecidos de histamina, sean rechazados para el consumo, y sean desechados, ya que las unidades no podrán ser utilizadas en ningún proceso posterior, para el consumo humano. (Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, 2011).

Por otra parte, las características perceptibles que pueden dar un indicio de altos contenidos de histamina, son los que marcan el deterioro del pescado, como color obscuro de la carne, olores fuertes que marquen deterioro de la carne. Esto no asegura que el producto contenga alta concentración de histamina, ya que el cambio de color puede deberse a factores múltiples, o al ataque previo de otras bacterias no productoras de la enzima descarboxilasa. Por eso es indispensable establecer valores cuantitativos de histamina por medio de la técnica utilizada en este trabajo, la cual nos brindó valores cuantitativos por medio de ELISA.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que el 18,7% que representan 3 de los 8 puestos analizados presentan valores promedio, superiores al valor de 50ppm permitidos por la FDA, esto podría indicar que estas muestras podrían ser una amenaza para la salud del consumidor.

El porcentaje superior al 80% del total de muestras analizadas están dentro de lo que podría denominarse como “pescado con bajo contenido en ppm de histamina” comercializado en el mercado “10 de Agosto” de la ciudad de Cuenca. El pescado expendido en su mayoría no es perjudicial para los consumidores, se puede mencionar que los puestos en donde los niveles fueron elevados, marcaron una regularidad en la presencia en cada análisis, por cada uno de los días en los que se realizó la toma de la muestra y las lecturas respectivas.

Comparando los resultados de cada semana entre los puestos de muestreo se puede establecer que en cada una de las semanas se pueden observar que existen valores que sobrepasan los límites establecidos, marcando una recurrencia en tres de los ocho puestos.

RECOMENDACIONES

- Capacitar a los vendedores de mariscos por medio de las entidades competentes como el Arcsa (Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria), sobre la importancia de mantener parámetros controlados en el almacenamiento del producto tales como mantener el pescado la mayor parte de tiempo en hielo, ya sea en su fase de transporte y almacenamiento, garantizando que el pescado mantenga sus características organolépticas en condiciones óptimas, sirviendo de gran ayuda al vendedor a no perder el producto y aportando un pescado con concentraciones de histamina dentro de los parámetros.
- Llevar a cabo la vigilancia y monitoreo continuo de las prácticas de higiene que mantienen cada uno de los distintos puestos por personal de entidades competentes.
- Se recomienda que el estudio pueda continuarse con una monitorización de las concentraciones de histamina en otros mercados de la ciudad, así como en otras especies de pescado que sean de consumo frecuente en la población también se puede llevar este análisis a otros productos derivados del mar a los cuales se puede aplicar esta técnica.
- Llevar a cabo el análisis rutinario de histamina, utilizando para ello el método ELISA que sería una prueba necesaria para que el producto sea vendido con un control de las concentraciones de histamina.

BIBLIOGRAFÍA

Documentos de la FAO. (2010). ASPECTOS DE LA CALIDAD ASOCIADOS CON LOS PRODUCTOS PESQUEROS. *Food and Agriculture Organizatión*, http://www.fao.org/docrep/003/T1768S/T1768S04.htm.

American Medical Association. (2004). *Centro para la Seguridad Alimentaria y la Nutrición Aplicada Administración de Drogas y Alimentos.* MMVR.

Aquino, G., Molina, A., & Arias, A. (2012). Regulacion de Receptores H3. *Gaceta medica de mexico*, 467 - 475.

Baraggi, N., Velázquez, A., & Castro, S. (Junio de 2010). *Scielo*. Obtenido de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872010000100012

Borodulima, T. (01 de Julio de 2016). *Uagraria.edu.ec.* Obtenido de http://www.uagraria.edu.ec/publicaciones/revistas_cientificas/quinta-ola-2/CIEA-EA-MAF-012.pdf

Bover, S., & Latoore, L. (2005). *Aminas biógenas en productos.* Obtenido de http://www1.clermont.inra.fr/tradisausage/Publi/Spain/Eurocarne%20141.pdf

Bover, S., & Latoore, L. (205). Aminas biógenas en productos. *EUROCARNE*, 1-10. Obtenido de http://www1.clermont.inra.fr/tradisausage/Publi/Spain/Eurocarne%20141.pdf

Caceres, A., & Muñoz, J. (27 de Enero de 2007). *Medisan.* Obtenido de http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol1_1_97/san05197.pdf

Carbajal, A. (2010). *Universidad Complutense de madrid.* Obtenido de https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-cap-11-vitaminas.pdf

Cid, N. (2011). *Universidad de Chile* . Obtenido de http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2011/fac586d/doc/fac586d.pdf

CK Murray, G. H. (07 de 2015). *Biblioteca nacional de Medicina de EEUU.* Obtenido de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2133850/

Diaz, E., & Cruces, V. (15 de Marzo de 2011). *Universidad de Argentina* . Obtenido de http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v22n6/art06.pdf

Fernandez, M., & Alvarez, M. (2005). *AGROCSIC.* Obtenido de http://digital.csic.es/bitstream/10261/5771/1/IPLA_AGROCSIC_2.pdf

Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. (2011). Obtenido de https://eos.ucs.uri.edu/EOS_Linked_Documents/flsgp/SGR_131_Spanish_FDA_Guide_web.pdf

Fundacion Vasca para la seguridad Agroalimentaria. (28 de Febrero de 2013). *www.elika.eus.* Obtenido de http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento100/13.Histamina.pdf

Galvez, M., & Domínguez, A. (2015). Intoxicación histaminica o escombroidosis en pescados. *ISSN*, 68-73.

Gomez, C. (Mayo de 2003). *Centro Nacional de Informacion de Medicamentos .* Obtenido de http://sibdi.ucr.ac.cr/boletinespdf/cimed12.pdf

Gozzi, M., Piacente, M., & Cruces, V. (2011). Influencia de la Temperatura de Conservación sobre la formacion de Histamina. *Scielo*, 53 - 62.

Hernández, M., & Rios-Lugo, M. (2009). Rol biológico del selenio en el humano . *Quimica Viva* , 70-75.

Humberto, G. (2001). Antihistaminicos . *Farmacol Terap*, 16 - 20.

Huss, H. (1997). Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. *FAO DOCUMENTO TECNICO DE PESCA 334*, http://www.fao.org/docrep/003/T1768S/T1768S00.htm#TOC.

Institut Ferran de Reumatologia . (2010). *www.institutferran.org.* Obtenido de http://www.institutferran.org/documentos/dieta_sin_histamina.pdf

Iriarte, M., & Torres, M. (2013). Incidencia de histamina y de bacterias indicadoras de calidad higiénica. *Scielo*, 1-7.

Izquierdo, P., Cespedes, E., & Camacho, M. (2008). Aminas biógenas en vinos venezolanos. *Redalyc*, 139 - 147.

Lehane, L. (2000). Update for histamina fish. *Med. Journal*, 149 - 153.

Lehane, L. (2000). Update for histamina fish poisoning. *Med. Journal Aust.*, 149 - 152.

M.A, P. (2003). Intoxicacion por alimentos y plantas . *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 7-9.

Maintz, L., & Novack, N. (2007). Histamina e intolerancia histaminica . *The American Journal Nutrition*, 1185 - 1196.

May, P. (06 de Mayo de 2008). *University of Bristol.* Obtenido de http://www.chm.bris.ac.uk/motm/histamine/h/histidine.htm

Medina, V., Croci, M., & Crescenti, E. (2010). *Universidad de Buenos Aires .* Obtenido de http://www.crescenti.com.ar/biblioteca/SAIC-2006-Medina-H3.pdf

Mena, R. (2007). *Revistas Portales Medicas.* Obtenido de http://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/escombroidosis-intoxicacion-escombroide/3/

Ministerio de Agricultura, Ganaderia, Acuacultura y Pesca . (2015). *Instituto de Pesca.gob.ec.* Obtenido de http://www.institutopesca.gob.ec/programas-y-servicios/atun/

Montes, J., & Flores, J. (2005). Histamina, receptores y antagonistas . *Revista medica del Hospital General* , 164 - 169.

Müller GJ, L. J. (01 de 01 de 2016). Obtenido de http://www.netcegroups.com/coursecontent.php?courseid=1288

Nollet, L., & Toldra, F. (2016). Análisis de Seguridad de los Alimentos de Origen Animal. En F. T. Leo ML Nollet, *Análisis de Seguridad de los Alimentos de Origen Animal* (págs. 289-292). CRC: Press.

Pacheco, J. (2013). *Instituto nacional de pesca.* Obtenido de http://200.107.61.10/wp-content/uploads/2014/08/2-Aspectos-biol%C3%B3gicos-y-Pesqueros-del-At%C3%BAn-Aleta-Amarilla-Capturado-por-la-Flota-Atunera-Cerquera-2009-2013.pdf

Pacheco, J., Romero, M., & Peralta, L. (2015). *http://www.institutopesca.gob.ec/.* Obtenido de http://www.institutopesca.gob.ec/wp-content/uploads/2014/08/REPORTE-DE-LA-ACTIVIDAD-DE-PESCA-DE-LA-FLOTA-ATUNERA-CERQUERA-ECUATORIANA-PERIODO-2012-%E2%80%93-2015.pdf

Pardo, A. (2004). Importanica de las Vitaminas en la Nutricion. *Revista Internacional de medicina y Ciencias de la Actividad* , 233-242.

Pavel, K. (2009). Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines. *Applied Biomedicine*, 65-74. Obtenido de http://www.zsf.jcu.cz/jab_old/7_2/kalac.html

Pintulanba, A. (Diciembre de 2013). *Andres Pintulana S.A.* Obtenido de http://www.pintaluba.com/2012/pintaluba/ftp/340_20140102040336.pdf

Revistas Medicas . (2007). *Revistas Portales Medicas .* Obtenido de http://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/escombroidosis-intoxicacion-escombroide/3/

Rivas, A., & Carrascosa, A. (2010). *Ciencia & Desarrollo Nutricion Aplicada* . Obtenido de file:///C:/Users/gabri/Downloads/388268.pdf

Saithon, K. (27 de Marzo de 2008). *Fisheries Oseanographyc.* Obtenido de http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2419.2008.00461.x/full

Sánchez, S. (2005). *Universitat de Barcelona.* Obtenido de http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42491?mode=full

Tapia, M. (Septiembre de 2000). Obtenido de http://eprints.uanl.mx/5507/1/1080124481.PDF

Tapia, M. (Septiembre de 2000). *Universidad Autonoma de Nuevo Leon.* Obtenido de http://eprints.uanl.mx/5507/1/1080124481.PDF

Taylor, S. (2010). Food Allergies. *Food technol*, 14-27.

Texeiria, E., Azevedo, G., & Carmona de Sao, S. (Enero de 2001). Evaluacion del contenido de histamina en el atun. *Avances en Ciencias Veterinarias* , 68-71. Obtenido de http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/viewFile/9230/9256

Velasquez, M. (2014). *Ministerio de Agricultura, Alimentacion y Medio Ambiente.* Obtenido de http://www.mapama.gob.es/es/pesca/temas/mercados-economia-pesquera/11_INFORME_ATUN_MARZO_2014_tcm7-337194.pdf

Villa, J. (2015). *Panorama creativo.com.* Obtenido de http://www.saludybuenosalimentos.es/alimentos/index.php?s1=Pescados&s2=Pescado+Azul&s3=Bonito

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de culminación del periodo práctico del trabajo de investigación.

UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
LABORATORIO DE ANALISIS DE AGUA Y ALIMENTOS
Análisis Microbiológico

Cuenca, 13 de Marzo de 2017

CERTIFICADO

A petición de los señores tesistas, Christian Gabriel Montesel Pastuzo (CI: 0104360748) y Franklin Omar Rodríguez Tapia (CI:0104909601), certifico que realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, los análisis correspondientes a la parte práctica de su tesis titulada "DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HISTAMINA EN LA ESPECIE THUNNUS ALALUNGA, EXPENDIDO EN EL MERCADO MUNICIPAL "10 DE AGOSTO", CUENCA. ECUADOR", en el periodo comprendido desde el 30 de noviembre al 21 de diciembre del 2016, bajo la supervisión de la Dra. Mariana Saá y la BQF. María Montaleza.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo a los peticionarios a hacer uso del presente de la manera que creyeren conveniente.

Atentamente,
UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
LABORATORIO DE ANALISIS MICROBIOLOGICO
DE AGUA Y ALIMENTOS
Dra. Mariana Saá Cruz, Mg.
Responsable-Analista
Lab. Microbiología de Alimentos
Analista Responsable

Av. 12 de Abril y Av. Loja S/N
Telefs: 405 1000 Ext. 2450 - 2421
CUENCA - ECUADOR

UNIVERSIDAD DE CU
desde 1867

Anexo 2. *Fish and Fishery products. Hazard and Controls Guidance*. Capítulo 7. Formación de escombrotoxina histamina. Pág. 115-120.

La Alianza Nacional de HACCP para Mariscos y Pescados para Capacitación y Educación tradujo este documento del inglés al español. Esperamos que encuentre útil esta traducción. A pesar de que la Alianza Nacional de HACCP para Mariscos y Pescados para Capacitación y Educación ha tratado de realizar una traducción lo más fiel posible a la versión en inglés, reconocemos que es posible que la versión traducida no sea tan precisa, clara o completa como la versión en inglés. Para fines legales y normativos de los Estados Unidos, el documento en inglés es la versión oficial.

Orientación de controles y peligros de los productos pesqueros y piscícolas [Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance]

cuarta edición: Abril de 2011

Puede comprar copias adicionales en:

Florida Sea Grant
IFAS - Extension Bookstore
University of Florida
P.O. Box 110011
Gainesville, FL 32611-0011
(800) 226-1764

O

www.ifasbooks.com

O puede descargar una copia desde el sitio web:
http://www.fda.gov/FoodGuidances

Usted puede enviar comentarios por escrito o vía electrónica sobre esta orientación en cualquier momento. Envíe comentarios electrónicos a *http://www.regulations.gov*. Los comentarios por escrito los puede enviar a: Division of Dockets Management (HFA-305), Food and Drug Administration, 5630 Fishers Lane, rm. 1061, Rockville, MD 20852. Todos los comentarios se deben identificar con el número de expediente indicado en el aviso de disponibilidad que se publica en el *Registro Federal*.

El Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU.
Centro para la Seguridad de los Alimentos y Nutrición Aplicada de la
Administración de Medicamentos y Alimentos
(240) 402-2300

Abril de 2011

Este documento se tradujo a partir de la versión en inglés. Solo se puede utilizar la versión en inglés para fines legales y normativas de los Estados Unidos.

CAPÍTULO 7: Formación de escombrotoxina (histamina)

Esta orientación representa el punto de vista actual sobre este tema de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés). No crea ni otorga derecho alguno a ninguna persona y no es vinculante para la FDA ni para el público. Usted puede usar otro enfoque, si dicho enfoque cumple los requisitos de las leyes y los reglamentos pertinentes. Si quiere analizar la posibilidad de usar otro enfoque, comuníquese con el personal de la FDA responsable de la implementación de esta orientación. Si no puede identificar al miembro adecuado del personal de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU., llame por teléfono al número que se indica en la portada de esta orientación.

ACERCA DEL PELIGRO POTENCIAL

La formación de escombrotoxina (histamina) como resultado del abuso del tiempo y la temperatura de ciertas especies de pescado puede provocar una enfermedad a los consumidores. La enfermedad está estrechamente asociada con el desarrollo de histamina en estos pescados. En la mayoría de los casos, los niveles de histamina en los pescados que provocan la enfermedad han estado sobre 200 ppm, a menudo sobre 500 ppm. Sin embargo, existen algunas pruebas de que otras sustancias químicas (por ejemplo, aminas biógenas, como la putrescina y la cadaverina) también pueden tener alguna participación en la enfermedad. El posible papel de estas sustancias químicas en la enfermedad de los consumidores es el tema del Capítulo 8.

La intoxicación por esombrotoxinas relacionada con mariscos y pescados se asocia principalmente con el consumo de atún, dorado, marlín y anjova. La Tabla 3-2 (Capítulo 3) señala otras especies que también pueden desarrollar niveles elevados de histamina cuando se produce el abuso de temperatura.

La enfermedad causada por el consumo de pescado en el que se formó escombrotoxina se denomina de forma más apropiada "intoxicación por escombrotoxina". La enfermedad se ha conocido históricamente por otros nombres. Originalmente, la enfermedad se llamó "intoxicación por escombrotoxina" por su asociación con pescados en las familias Scombridae y Scomberesocidae. Sin embargo, ahora se sabe que otras especies de pescados causan la enfermedad. Los términos "intoxicación por histamina" e "intoxicación por histamina de pescado" también se han aplicado a la enfermedad. Sin embargo, debido a que aminas biógenas que no son histamina se han asociado con la enfermedad, estos términos también presentan dificultados. Sin embargo, este capítulo hace referencia a las medidas de control para prevenir la formación de histamina. Se espera que los métodos de control usados para inhibir las bacterias que ocasionan la formación de histamina también inhiban las bacterias que producen otras aminas biógenas.

Algunos síntomas de intoxicación por escombrotoxina son: hormigueo o ardor en o alrededor de la boca o garganta; sarpullido o urticaria en la parte superior del cuerpo; una baja de la presión arterial; dolor de cabeza; mareos; picazón en la piel; náuseas; vómitos; diarrea; opresión similar al asma de las vías respiratorias; palpitación del corazón y dificultad respiratoria. Los síntomas generalmente se producen entre unos minutos y unas horas del consumo y duran desde 12 horas hasta algunos días.

- **Formación de escombrotoxina (histamina)**

Algunas bacterias producen la enzima histidina descarboxilasa durante el crecimiento. La enzima reacciona con la histidina, un aminoácido que se forma de manera natural y que se encuentra en grandes cantidades en algunos pescados más que en otros. El resultado es la formación de la escombrotoxina (histamina).

Las bacterias formadoras de histamina son capaces de formar y producir histamina en un amplio rango de temperatura. Sin embargo, la proliferación de histamina es más rápida a altas temperaturas (por ejemplo, 70 °F [21.1 °C] o superiores) que en temperaturas de abuso moderadas (por ejemplo, 45

°F [7.2°C]). La proliferación es especialmente rápida a temperaturas cercanas a los 90 °F (32.2 °C). La histamina es más comúnmente el resultado de la descomposición por la alta temperatura que la descomposición a relativamente baja temperatura de más largo plazo, que comúnmente está asociada con descomposición detectable de forma organoléptica. Sin embargo, hay una serie de oportunidades para que se forme histamina en condiciones de temperatura de abuso más moderada.

Una vez que la enzima histidina descarboxilasa está presente en el pescado, puede seguir produciendo histamina en el pescado aunque las bacterias no estén activas. La enzima puede estar activa a temperaturas de refrigeración o casi refrigeración. La enzima se mantiene estable mientras está en el estado congelado y se puede reactivar muy rápidamente después de la descongelación.

El congelamiento puede inactivar algunas de las bacterias formadoras de enzimas. Tanto la enzima como las bacterias se pueden inactivar mediante cocción. Sin embargo, cuando se ha producido la histamina, no se puede eliminar mediante calor (incluido el uso de autoclave) o congelamiento. Después de la cocción, se requiere volver a contaminar el pescado con las bacterias que producen enzimas para que se forme más histamina. Por estos motivos, es más probable el desarrollo de histamina en pescados crudos no congelados, pero no se debe descartar en otras formas del producto de especies de pescados formadoras de escombrotoxina.

Los tipos de bacterias que están asociados con el desarrollo de histamina están comúnmente presentes en el entorno de agua salada. Existen de forma natural en las branquias, en superficies externas, y en el intestino de peces de agua salada, sin causar daños a los peces. Al morir, los mecanismos de defensa del pescado dejan de inhibir el crecimiento bacteriano en el tejido muscular y las bacterias formadoras de histamina pueden comenzar a crecer, lo que ocasiona la producción de histamina. La evisceración y la extracción de las branquias puede reducir, aunque no eliminar, la cantidad de bacterias formadoras de histamina. Empacar la cavidad visceral con hielo puede ayudar a enfriar pescados grandes en los que las temperaturas musculares internas no se pueden reducir fácilmente. Sin embargo, cuando se realizan incorrectamente, estos pasos pueden acelerar el proceso de desarrollo de histamina en las partes comestibles del pescado al propagar las bacterias desde la cavidad visceral a la carne del pescado.

Con algunas prácticas de pesca, como palangre y enmalle, la muerte se puede producir muchas horas antes de que los pescados sean sacados del agua. En las peores condiciones, la formación de histamina ya puede estar desarrollándose antes de que los pescados sean subidos al barco. Esta condición puede empeorar aún más con algunas especies de atún que generan calor, lo que origina temperaturas internas que pueden exceder las temperaturas ambientales y aumentar la probabilidad de condiciones favorables para el crecimiento de bacterias formadoras de enzimas.

La posibilidad de la formación de histamina aumenta cuando el músculo de los pescados formador de escombrotoxina está en contacto directo con las bacterias formadoras de enzima. Este contacto directo se produce cuando se procesan los pescados (por ejemplo, la matanza o fileteado) y puede ser especialmente problemático cuando la proporción de superficie a volumen del músculo del pescado expuesto es grande, como el atún desmenuzado para ensaladas. Incluso cuando esos productos se preparan con pescado enlatado o en envases flexibles herméticos, se puede producir una nueva contaminación durante la preparación de la ensalada, especialmente al agregar los ingredientes crudos. La mezcla de las bacterias por todo el producto y la alta proporción de superficie a volumen puede significar una considerable formación de histamina si se produce un abuso del tiempo y la temperatura.

Como mínimo, una parte de las bacterias formadoras de histamina son halotolerantes (toleran los medios salinos) o halófilos (viven mejor en medios salinos). Algunas son más capaces de producir histamina a una acidez elevada (bajo pH). Por consiguiente, la formación de histamina es posible durante procesos como el salmuerado, la salazón, el ahumado, el secado, la fermentación y el encurtido hasta que el producto es completamente no perecedero. Se puede usar la refrigeración para inhibir la formación de histamina durante estos procesos.

Una serie de bacterias formadoras de histamina son anaerobias facultativas que pueden crecer en ambientes con oxígeno reducido. Como consecuencia, el envasado con oxígeno reducido

CAPÍTULO 7: Formación de escombrotoxina (histamina)

114

(por ejemplo, el envasado al vacío, el envasado en atmósfera modificada y el envasado en atmósfera controlada) no se debe considerar como inhibidor de la formación de histamina.

La histamina es soluble en agua (se disuelve en el agua) y no debiera de esperarse en cantidades significativas en productos como el aceite de pescado que no tiene un componente de agua. Sin embargo, la histamina podría estar presente en productos, como el concentrado de proteína de pescado que se prepara a partir de los componentes musculares o acuosos del tejido de pescado.

- **Controlar la formación de escombrotoxina (histamina)**

El enfriamiento rápido de los pescados formadores de escombrotoxina inmediatamente después de la muerte es el elemento más importante en cualquier estrategia para prevenir la formación de escombrotoxina (histamina), especialmente para pescados que están expuestos a aguas o aire cálidos y para los atunes que generan calor en sus tejidos. Las siguientes son algunas recomendaciones:

- Los pescados expuestos a temperaturas de aire o agua superiores a 83 °F (28.3 °C) deben colocarse en hielo o en agua de mar refrigerada, hielo acuoso o salmuera a 40 °F o menos, tan pronto como sea posible después de la recolección, pero no después de 6 horas desde la hora de muerte.
- Los pescados expuestos a temperaturas de aire y agua superiores a 83°F (28.3 °C) deben colocarse en hielo o en agua de mar refrigerada, hielo acuoso o salmuera a 40°F (4.4 °C) o menos, tan pronto como sea posible durante la recolección, pero no después de 9 horas desde la hora de muerte.
- Los pescados sin branquias y eviscerados antes de enfriarlos, deben colocarse en hielo o en agua de mar refrigerada, hielo acuoso o salmuera a 40°F (4.4 °C) o menos, tan pronto como sea posible durante la recolección, pero no después de 12 horas desde la hora de muerte.
- Los pescados recolectados bajo condiciones que expongan al pescado muerto a aguas de recolección con temperaturas de 65 °F (18.3 °C) o menos, por 24 horas o menos, deben colocarse en hielo, agua de mar refrigerada, hielo acuoso o salmuera a 40 °F (4.4 °C) o menos, tan pronto como sea posible después de la recolección, pero no después de los tiempos límites indicados anteriormente, en donde el período de tiempo comienza cuando el pescado abandona el ambiente que está a una temperatura de 65 °F (18.3 °C) o menos.

Nota: Si se desconoce la fecha de muerte real, se puede utilizar una fecha aproximada de la muerte del primer pescado del conjunto (por ej., la fecha de inicio del despliegue de un palangre).

TABLA 7-1

TIEMPO MÁXIMO RECOMENDADO PARA PONER LOS PESCADOS EN UN MEDIO DE ENFRIAMIENTO A BORDO DE LOS BARCOS DE RECOLECCIÓN PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DE ESCOMBROTOXINA[1]

CUÁNDO...		EL TIEMPO MÁXIMO EN HORAS PARA PONER LOS PESCADOS EN UN MEDIO DE ENFRIAMIENTO (≤ 40 °F) DESDE LA HORA DE...	
LA TEMPERATURA DEL AGUA (°F) ES...	Y LA TEMPERATURA DEL AIRE (°F) ES...	MUERTE DE LOS PESCADOS O LA PRIMERA HORA APROXIMADA DE MUERTE ES...	EL DESEMBARQUE A BORDO ES...
PARA PESCADOS NO EVISCERADOS:			
> 65	> 83	6	--
> 83	Cualquiera	6	--
> 65, pero ≤ 83	≤ 83	9	--
≤ 65[2]	> 83	--	6
≤ 65[2]	≤ 83	--	9
PARA PESCADO EVISCERADO A BORDO ANTES DEL ENFRIAMIENTO:			
> 65	Cualquiera	12	--
≤ 65[2]	Cualquiera	--	12

1. Esta tabla es un resumen de las recomendaciones anteriores. Para una comprensión completa de las recomendaciones, consulte el texto anterior.
2. Siempre que la exposición de los pescados en el agua a 65 °F o menos sea ≤ 24 horas.

Los controles indicados anteriormente para el enfriamiento a bordo prevendrán la formación rápida de la enzima histidina descarboxilasa. Cuando ya se ha formado la enzima, es poco probable controlar el peligro. Es importante reconocer que los parámetros indicados anteriormente tienen como objetivo controlar la formación de escombrotoxina; estos criterios no pueden controlar eficazmente la actividad de otros organismos de descomposición, lo que da lugar a la posibilidad de que los pescados se puedan adulterar debido a la descomposición (no es un peligro para la seguridad de los alimentos cubierto por la norma Procedures for the Safe and Sanitary Processing and Importing of Fish and Fishery Products (Procedimientos para la elaboración e importación seguras e higiénicas de pescado y productos pesqueros), 21 CFR 123, denominado Seafood Hazard Analysis Critical Control Point (Análisis de riesgos y puntos críticos de control de pescados y mariscos) (HACCP) en este documento de orientación) antes de que se forme la escombrotoxina (histamina).

También es deseable un mayor enfriamiento hasta alcanzar el punto de congelación para proteger contra el desarrollo de histamina a menor temperatura que es menos común y a más largo plazo. Asimismo, la vida útil y la calidad del pescado se compromete significativamente cuando la temperatura del producto no disminuye rápidamente hasta acercarse al punto de congelación.

Aunque sea posible que un barco de recolección evite completamente el enfriamiento a bordo e igualmente entregue el pescado al procesador dentro de las limitaciones de tiempo y temperatura recomendadas más arriba para enfriar al pescado, no se recomienda realizar esta práctica. No enfriar a bordo puede permitir a las bacterias y enzimas, incluidas las que forman la escombrotoxina (histamina), aumenten innecesariamente.

El tiempo necesario para disminuir la temperatura interna del pescado después de su captura dependerá de una serie de factores, como:

- El método de recolección:
  - Las demoras en sacar los pescados del agua después de la captura, como los capturados por palangre, pueden limitar significativamente la cantidad de tiempo restante para el enfriamiento y puede permitir que algunos pescados aumenten su temperatura.
  - Grandes cantidades de pescados capturados en una sola red de pesca, como los capturados en un buque cerquero, puede superar la capacidad que tiene una nave de enfriar rápidamente el producto.
- El tamaño de los pescados.
- El método de enfriamiento:
  - El hielo por sí solo tarda más tiempo en enfriar los pescados que el hielo acuoso o el agua de mar refrigerada recirculada o la salmuera, como consecuencia de una menor área de contacto y transferencia de calor.
  - La cantidad de hielo o hielo acuoso y la capacidad de los sistemas agua de mar refrigerada o de salmuera, además de la disposición física de los pescados en los medios de enfriamiento deben ser adecuados para la cantidad de la captura.

Una vez enfriado, los pescados que forman escombrotoxina se deben mantener lo más cercanos al punto de congelación que sea posible (o mantener congelados) hasta su consumo. La exposición a temperaturas superiores a 40 °F (4.4 °C) se debe reducir al mínimo. La cantidad de tiempo posterior a la recolección a temperaturas elevadas (después del correcto enfriamiento a bordo del barco de recolección) a las que pueden exponerse los pescados (por ejemplo, durante el procesamiento, el almacenamiento y la distribución) sin efectos adversos depende principalmente de si los pescados se congelaron previamente (por ejemplo, a bordo del barco de recolección) o fueron tratados con calor suficiente para destruir las bacterias que forman escombrotoxina.

El almacenamiento congelado extenso (por ejemplo, 24 semanas) o la cocción reducen al mínimo el riesgo de desarrollo de histamina adicional al inactivar las bacterias que forman la enzima y, en el caso de la cocción, a la enzima misma. Como se mencionó anteriormente, la recontaminación con bacterias formadoras de la enzima y el abuso de la temperatura significativo son necesarios para la formación de histamina después de la cocción. Dicha recontaminación puede no ser probable si los pescados se procesan según un programa de salubridad esmerado. Sin embargo, la adición de ingredientes crudos, el contacto de los empleados o las condiciones de higiene deficientes podrían volver a introducir la contaminación. A continuación se ofrece una mayor orientación:

- Los pescados que forman escombrotoxina que no se han congelado anteriormente ni se han tratado con calor suficiente para destruir las bacterias que forman escombrotoxina no se deben exponer a temperaturas superiores a 40 °F (4.4 °C) por:
  - más de 4 horas, acumulativamente, si durante algún período de tiempo la temperatura superó los 70 °F (21.1 °C); o
  - más de 8 horas, acumulativamente, siempre que en ningún momento de ese tiempo la temperatura superara los 70 °F (21.1 °C).
- Los pescados que forman escombrotoxina que han sido congelados previamente o han sido tratados con calor suficiente como para destruir la bacteria que forma la escombrotoxina y son manejados posteriormente de una manera en que haya una oportunidad de volver a contaminarlos con la bacteria que forma la escombrotoxina (por ejemplo, contacto con pescado fresco, empleados o la incorporación de ingredientes crudos), no debe exponerse a temperaturas superiores a 40 °F (4.4 °C) para:
  - más de 12 horas, acumulativamente, si durante algún período de tiempo la temperatura superó los 70 °F (21.1 °C); o
  - más de 24 horas, acumulativamente, siempre que en ningún momento de ese tiempo la temperatura superara los 70 °F (21.1 °C).
- Los pescados que forman escombrotoxina que han sido tratados con calor suficiente como para destruir la bacteria que forma la escombrotoxina y las enzimas y no son manejados posteriormente de una manera en que haya una oportunidad de volver a contaminarlos con la bacteria que forma la escombrotoxina (por ejemplo, ausencia de contacto con pescado fresco, empleados o ingredientes crudos) tiene un bajo riesgo de un desarrollo posterior de escombrotoxina (histamina).

TABLA 7-2		
HORAS MÁXIMAS RECOMENDADAS DE EXPOSICIÓN DE PESCADOS QUE FORMAN ESCOMBROTOXINA A TEMPERATURAS AMBIENTE SUPERIORES A 40 °F PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DE ESCOMBROTOXINA DESPUÉS DEL CORRECTO ENFRIAMIENTO A BORDO DE UN BARCO DE RECOLECCIÓN, PARA EXPOSICIÓN A TEMPERATURAS Y CONDICIONES DE PROCESAMIENTO PREVIAS DISTINTAS[1]		
CUANDO LA TEMPERATURA AMBIENTE (°F) DE EXPOSICIÓN ES...	LUEGO, LAS HORAS MÁXIMAS DE TIEMPO DE EXPOSICIÓN PARA...	
	Pescado fresco (no tratado con calor ni congelado previamente) es ...	Pescado congelado previamente o tratado con calor (que se ha expuesto a una posible recontaminación), es...
> 70 EN CUALQUIER MOMENTO	≤ 4	≤ 12
≤ 70 DURANTE TODA LA EXPOSICIÓN	≤ 8	≤ 24
1. Esta tabla es un resumen de las recomendaciones anteriores. Para una comprensión completa de las recomendaciones, consulte el texto anterior.		

- **Detección**

Evaluación sensorial

La evaluación sensorial generalmente se usa para seleccionar pescados que presentan indicadores de descomposición que se desarrollan cuando estos se exponen a un abuso del tiempo y la temperatura. Específicamente el olor es un medio eficaz de detección de pescados que se ha sometido a diversas condiciones de abuso. Sin embargo, los olores de la descomposición que son típicos de la descomposición a temperatura relativamente baja pueden no estar presentes si el pescado ha sufrido una descomposición a alta temperatura. Esta condición hace que la inspección sensorial por sí solo no sea un control eficaz para prevenir la formación de escombrotoxina (histamina).

Es importante reconoce que la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (la Ley FFD&C) prohíbe el comercio interestatal de alimentos adulterados (21 U.S.C. 331). En virtud de la Ley FFD&C, un alimento que está descompuesto se considera adulterado (21 U.S.C 342). Por consiguiente, está prohibido que un pescado o producto piscícola que está descompuesto total o parcialmente ingrese al comercio interestatal aunque el tipo de descomposición puede no llevar a la formación de escombrotoxina (histamina). Debe distinguir entre las recomendaciones en este capítulo para una inspección sensorial, como componente de una estrategia de control HACCP para la formación de escombrotoxina, y su obligación de evitar que se infrinja de otro modo la Ley FFD&C con respecto a la distribución de alimentos descompuestos.

Pruebas químicas

Las pruebas químicas son un medio eficaz de detección de la presencia de histamina en la carne de pescado. No obstante, la variabilidad de los niveles de histamina entre pescados y en un solo pescado puede ser grande, incluso en pescados procedentes del mismo barco de recolección. Por este motivo, se estableció un nivel de orientación de 50 ppm de histamina en la parte comestible del pescado. Si se detectan 50 ppm en un corte de un pescado o de un lote, existe la posibilidad de que otros cortes puedan superar las 500 ppm.

Debido a que la histamina generalmente no está distribuida de manera uniforme en un pescado o en un lote, la validez de los análisis de histamina dependen del diseño del plan de muestreo. La cantidad de muestras requeridas para tener en cuenta esa variabilidad de distribución es necesariamente bastante grande. El método de recolección de la muestra de pescado también es fundamental. En los pescados grandes que forman escombrotoxina, la parte inferior y anterior (delantera) del lomo del pescado (no la pared abdominal) ofrece más posibilidades de encontrar la mejor información sobre el contenido de histamina del pescado. La cantidad de muestras (es decir, los pescados que forman escombrotoxina) necesaria para tomar una decisión sobre un lote depende de la variabilidad prevista, pero no debe ser menor que 18 muestras por lote, a menos que el lote contenga menos de 18 pescados, en cuyo caso se debe recolectar una muestra de cada pescado.

Cuando las muestras sean compuestas para reducir la cantidad de análisis necesarios de un lote, se debe realizar de una manera que asegure la obtención de resultados significados. No más de tres muestras deben ser compuestas, a fin de reducir al mínimo la ocultación de los pescados problemáticos. Asimismo, el método analítico y el instrumento usado debe ser capaz de detectar la histamina de forma confiable en los niveles más bajos que sean necesarios para las muestras compuestas (por ejemplo, 17 ppm de histamina en un compuesto de tres muestras, en lugar de 50 ppm en una muestra no compuesta).

La combinación de indicadores adicionales de condiciones que pueden llevar a la formación de histamina, como la inspección sensorial y la medición de la temperatura interna, con los análisis de histamina puede proporcionar una mayor certeza de la seguridad del producto. La observación de la presencia de huecos tipo panal (vacíos en la carne del pescado) en los lomos de los atunes cocidos previstos para enlatado es un medio valioso de detección de pescados expuestos a los tipos de abuso de temperatura que pueden llevar al desarrollo de histamina. Cualquier pescado que forma escombrotoxina que desmuestre el rasgo debe destruirse o desviarse a un uso que no sea para alimento.

CAPÍTULO 7: Formación de escombrotoxina (histamina)

100

Anexo 3. Ficha técnica del kit VERATOX® histamina.

Lea las instrucciones detenidamente antes de comenzar el análisis

Veratox®

Análisis Cuantitativo de Histamina

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE CERTIFICATE NO. 990903

REFRIGÉRESE A 2-8°C (35-46°F)
NO LO CONGELE

LA HISTAMINA

Se pueden desarrollar niveles altos de histamina en diversas especies de pescados a medida que éstos se descomponen. Estas especies incluyen atún, dorado, aguja, anjova, sardina, anchoa, bonito, arenque y caballa. La ingestión de histamina puede causar intoxicación escombroide en humanos, que puede dar lugar a una variedad de síntomas, entre ellos, erupción cutánea, náuseas, vómitos, diarrea, hipotensión, palpitaciones y debilidad muscular. También se ha informado casos de parálisis y muerte en casos de intoxicación escombroide.

Debido a su potencial de provocar enfermedad en humanos, la Dirección Federal de Fármacos y Alimentos (FDA) de EE.UU. ha establecido la inclusión de registros de refrigeración prolongada o de análisis de histamina en el programa de Análisis de riesgo y puntos críticos de control (Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP) para las especies de pescados pertinentes. La FDA ha establecido un nivel de acción de 50 partes por millón (ppm) para la histamina en el pescado nacional e importado.

USO PREVISTO

Veratox for Histamine está diseñada para el análisis cuantitativo de la histamina en especies de pescados escombroides, tales como atún, anjova y dorado.

USUARIO PREVISTO

El equipo de análisis se ha diseñado para su uso por el personal responsable del control de la calidad y demás personas familiarizadas con el análisis de la histamina en el pescado. Debido a la suma importancia de la técnica, los usuarios necesitarán la capacitación impartida por un representante de Neogen o por alguien que haya completado la capacitación de Neogen.

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO

Este equipo puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se conserva refrigerado a 2-8°C (35-46°F).

PRINCIPIOS ANALÍTICOS

Veratox for Histamine es un enzimoinmunoanálisis de adsorción directo competitivo (CD-ELISA, por sus siglas en inglés) que permite obtener concentraciones exactas de histamina expresadas en partes por millón (ppm). Se permite que la histamina libre de las muestras y controles compita con la histamina enzimomarcada (el conjugado) por los sitios de adsorción de los anticuerpos. Tras un lavado, se agrega un sustrato que reacciona con el conjugado adsorbido para producir el color azul. Más color azul significa menos histamina. El análisis se lee en un

de pocillos para obtener densidades ópticas. Con las densidades ópticas de los controles se traza la curva a. luego las densidades ópticas de la muestra se grafican contra esa curva calculando así la concentración de histamina.

MATERIALES SUMINISTRADOS

- 48 pocillos con revestimiento de anticuerpo
- 48 pocillos de mezclar marcados en rojo
- 6 frascos con etiquetas amarillas de controles de histamina con 0, 2,5, 5, 10, 20 y 50 ppm
- Un frasco con etiqueta azul de solución de conjugado de histamina y peroxidasa de rábano (HRP)
- 1 bolsa de papel metálico con 10 mM de polvo PBS, el concentrado buffer diluyente del extracto de la muestra
- 1 frasco de 40 ml de concentrado de buffer para lavado con 10 mM de Tween PBS
- 1 frasco con etiqueta verde de solución de sustrato K-Blue®
- 1 frasco con etiqueta roja de solución "Red Stop"

MATERIALES RECOMENDADOS QUE NO SE INCLUYEN

Materiales para obtención de extractos (los artículos "b" a "d" están disponibles en un equipo de Neogen, artículo N° 9510):

a. Agua destilada o desionizada
b. Frascos desechables con capacidad de 125 ml
c. Jeringuillas filtrantes de Neogen, papel de filtro Whatman N° 1, o equivalente
d. Tubos para recolección de muestras

- Probeta graduada de 100 ml
- Mezclador
- Soporte para tubos de ensayo (artículo Neogen N° 9443)
- 16 tubos de ensayo de 100 mm
- Balanza capaz de pesar 10-50 gramos (artículo Neogen N° 9427)
- Lector de tiras de pocillos con un filtro de 650 nm (artículo Neogen N° 9302)
- Pipeta de 12 canales (artículo Neogen N° 9273)
- Pipeta de 100 µl (artículo Neogen N° 9272)
- Puntas para pipetas de 100 µl y de 12 canales (artículo Neogen N° 9410)
- Toallas de papel o de un material absorbente equivalente
- Soporte de pocillos (artículo Neogen N° 9402)
- Cronómetro (artículo Neogen N° 9426)
- Marcador resistente al agua
- Frasco de lavado (artículo Neogen N° 9400)
- Frasco de 1 litro con tapa
- 2 cubetas de reactivo para pipeta de 12 canales (artículo Neogen N° 9435)
- Agua destilada o desionizada

PRECAUCIONES

1. Guarde el equipo de análisis a 2-8°C (35–46°F) cuando no se utilice.
2. No utilice componentes del equipo que estén caducados.
3. No deben utilizarse recipientes de vidrio para obtener extractos. Debido a que la histamina puede adherirse al vidrio, el uso de recipientes de vidrio puede afectar los resultados del análisis.
4. No mezcle reactivos de una serie del equipo de análisis con los de otra serie.
5. No trabaje con más de 24 pocillos por análisis.
6. Observe las técnicas de pipeteo adecuadas, incluido el cebado de la punta que consiste en llenarla y vaciarla de solución una vez antes de su uso.
7. El uso de plazos de incubación distintos de los especificados puede ocasionar resultados inexactos.
8. Los equipos de análisis deben estar a una temperatura de 18-30°C (64-86°F) antes de su uso.
9. Evite un almacenamiento prolongado de los equipos a temperaturas ambiente.
10. No congele los equipos de análisis.
11. Para evitar contaminaciones cruzadas, utilice puntas de pipeta limpias para cada muestra.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

1. **Sustrato.** El sustrato azul K-Blue está listo para su uso. El color de este sustrato ha de oscilar entre transparente y azul claro; deséchelo, si se ha oscurecido. Vierta sólo el volumen necesario de sustrato en una cubeta de reactivo. No devuelva al frasco el sustrato que no haya utilizado. Cubra la cubeta de reactivo para proteger el sustrato de los efectos de la luz hasta que lo necesite.
2. **Controles.** Se incluyen 6 controles en este equipo. Neogen recomienda utilizar una combinación de, al menos, 5 controles con cada análisis. Esta combinación puede variar. Una combinación posible es eliminar el control

de 5 ppm, para obtener resultados correspondientes a un análisis cuantitativo completo en el intervalo de 2,5 a 40 ppm. Otra posibilidad es eliminar el control de 2,5 ppm para obtener resultados en el intervalo de 5 a 40 ppm. Los 6 controles pueden utilizarse con un lector de pocillos Awareness para una cuantificación completa de la histamina en el intervalo de 2,5 a 40 ppm. De ser necesario, póngase en contacto con Neogen para obtener más información sobre el uso de los controles.

3. **Buffer diluyente del extracto de la muestra.** Para prepararlo, agregue una bolsa de papel metálico que contiene el buffer del extracto a 1 litro de agua destilada o desionizada. Agite para mezclar. Guarde el buffer restante, tapado y a temperatura ambiente.
4. **Buffer para lavado.** El buffer para lavado se proporciona como un concentrado a una proporción de 1:25. Para prepararlo, mezcle el concentrado del buffer para lavado (40 ml) con 960 ml de agua destilada o desionizada. Agite para mezclar, pero hágalo con suavidad. Guarde el buffer para lavado restante a temperatura ambiente.
5. **Pocillos de anticuerpos.** Mantenga los pocillos sellados en la bolsa de papel metálico hasta que los necesite. Extraiga los pocillos de la bolsa de papel metálico sólo después de obtener los extractos de las muestras y cuando el procedimiento de análisis esté listo para empezar.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

A. **Atún enlatado y embolsado:** AOAC 937.07b – Coloque todo el contenido de la lata o bolsa, la carne y el líquido, en el mezclador. Mezcle hasta obtener una mezcla homogénea. Guarde las muestras a 2–8°C (35–46°F) hasta que se analicen.
B. **Pescado crudo fresco o descongelado:** AOAC 937.07a – Limpie y extraiga las vísceras de tres pescados. Corte, en sentido transversal, tres pedazos de 2,5 cm (1 pulgada) de espesor, de la parte interna de la aleta pectoral, a mitad de camino del ano y un corte en la parte trasera del ano. Quítele las espinas y mezcle o triture las muestras combinadas hasta obtener una mezcla homogénea. Guarde las muestras a 2–8°C (35–46°F) hasta que se analicen.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE LA MUESTRA

Nota: si utiliza Veratox de Neogen en el equipo de obtención de extractos de histamina, siga las instrucciones que se incluyen en el equipo. Si usted prepara su propia solución para la obtención de extractos, proceda según las instrucciones que figuran a continuación.

1. Agregue 10 gramos de la mezcla homogénea a un frasco para obtener extractos, desechable y limpio, que contenga 90 ml de agua destilada o desionizada.
2. Cierre bien la tapa y agite vigorosamente el frasco durante 15 a 20 segundos a fin de lograr la suspensión del tejido de pescado en el agua.
3. Espere unos 5 minutos. Luego, agite el frasco por 15 a 20 segundos a fin de lograr nuevamente la suspensión del tejido de pescado.
4. Espere unos 5 minutos más. Luego, agite el frasco por 15 a 20 segundos a fin de volver a suspender el tejido de pescado. Deje que el tejido se asiente en el fondo del frasco durante unos 30 segundos.
5. Filtre el contenido en un recipiente limpio; para ello haga uso de un papel de filtro plegado o de una jeringuilla filtrante de Neogen. La muestra ya está lista para la disolución de extracto.

DISOLUCIÓN DEL EXTRACTO DE LA MUESTRA

Dada la sensibilidad del formato ELISA, el extracto de muestra se debe diluir antes de realizar el análisis (véase la nota de procedimiento N° 3 para preparar el buffer diluyente del extracto de la muestra).

1. Agregue 10 ml del buffer diluyente del extracto de la muestra en un tubo de ensayo o frasco limpio.
2. Utilizando una punta de pipeta limpia, agregue 100 µl de extracto filtrado al buffer diluyente del extracto de la muestra. Agite suavemente para mezclar.
3. La muestra ya está lista para analizarla. Siga el mismo procedimiento con todas las muestras.
   NOTA: para asegurar un rendimiento óptimo si se esperan resultados superiores a 40 ppm, se recomienda efectuar otra disolución del extracto de la muestra utilizando el buffer diluyente. Comience con una disolución por partes iguales, repita la disolución y el análisis si es necesario hasta que el nuevo resultado (antes de la aplicación del factor de disolución) sea inferior a 40 ppm. Se deben multiplicar por 2 los valores corregidos para el total X de repeticiones adicionales de estas disoluciones por partes iguales. Se deben analizar las muestras en un lapso no mayor de 4 horas después de la obtención de extractos.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Deje que todos los reactivos tengan una temperatura de 18-30 °C (64-86 °F) antes de utilizarlos.

1. Retire 1 pocillo de mezclar marcado en rojo por cada muestra que deba analizarse, además de 5 pocillos marcados en rojo para los controles, y colóquelos en el soporte de pocillos.

2. Retire la misma cantidad de pocillos con revestimiento de anticuerpo. Devuelva los pocillos de anticuerpos que no vaya a utilizar inmediatamente al paquete de papel metálico con desecante. Cierre el paquete de papel metálico para proteger el anticuerpo. Marque un extremo de la tira reactiva con un "1" y colóquela en el soporte de pocillos con el extremo marcado a la izquierda. No marque el interior ni el fondo de los pocillos.
3. Mezcle cada reactivo agitando vigorosamente su frasco antes de utilizarlo.
4. Vierta 100 µl de solución de conjugado procedente del frasco con etiqueta azul en cada pocillo de mezclar marcado en rojo.
5. Los controles (véase la nota de procedimiento N° 2) están listos para ser utilizados; no los disuelva. Utilizando una nueva punta de pipeta para cada uno, transfiera como se describe 100 µl de controles y muestras diluidas a los pocillos de mezclar marcados en rojo:

   Si le preocupan los niveles de histamina entre 2,5 y 40 ppm:

0	2,5	10	20	50	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Tira 1
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	Tira 2

   Si le preocupan los niveles de histamina entre 5 y 40 ppm:

0	5	10	20	50	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Tira 1
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	Tira 2

6. Utilizando una pipeta de 12 canales, mezcle el líquido de los pocillos pipeteándolo arriba y abajo tres veces. Transfiera 100 µl a los pocillos con revestimiento de anticuerpo.
7. Mézclelos deslizando durante 10 a 20 segundos el soporte de los pocillos hacia atrás y adelante sobre una superficie plana, evitando derramar los reactivos contenidos en los pocillos. Incúbelos durante 10 minutos a 18-30°C (64-86°F). Deseche los pocillos de mezclar marcados en rojo.
8. Agite los pocillos de anticuerpos para sacar su contenido. Llene cada pocillo de anticuerpos con solución buffer para lavado diluida y vacíelos. Realice esta operación 3 veces, luego invierta los pocillos y golpéelos ligeramente sobre una toalla de papel absorbente hasta que salga el líquido restante.
9. Vierta el volumen necesario de sustrato procedente del frasco con etiqueta verde en la cubeta de reactivo con etiqueta verde. Luego, usando puntas nuevas en la pipeta de 12 canales, pipetee 100 µl de sustrato en los pocillos.
10. Mézclelos deslizándolos hacia atrás y adelante sobre una superficie plana durante 10 a 20 segundos. Incúbelos durante 10 minutos. Deseche el sustrato restante y enjuague la cubeta de reactivo con agua.
11. Vierta solución "Red Stop" procedente del frasco con etiqueta roja (mismo volumen que el sustrato) en la cubeta de reactivo con etiqueta roja. Haciendo uso de las mismas puntas utilizadas con la pipeta de 12 canales para verter el sustrato, agregue 100 µl de solución "Red Stop" a cada pocillo y mézclelos deslizándolos hacia atrás y adelante sobre una superficie plana. Deseche las puntas.
12. Pase una toalla o paño seco por el fondo de los pocillos para luego efectuar la lectura en un lector de pocillos utilizando un filtro de 650 nm y el software Veratox de Neogen; enseguida calcule los resultados comparando con la curva típica. Elimine las burbujas de aire, porque podrían perjudicar los resultados analíticos. Los resultados deberán leerse en un lapso no mayor de 20 minutos después de completarse el análisis.
13. Se pueden desechar sin riesgo alguno todos los materiales en la basura.

REPETICIÓN DE ANÁLISIS

Si se obtienen resultados positivos en productos que no se habían analizado previamente, confírmelos con un método aprobado adicional antes de tomar medidas. Los resultados entre 2.5 y 40 ppm son cuantitativos. Para asegurar un rendimiento óptimo, los resultados superiores a 40 ppm deben diluirse en partes iguales con el buffer diluyente del extracto, tal y como se describe en la sección "Disolución del extracto de la muestra".

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Límite de la detección: 2 ppm (determinado por la media promedio de 10 muestras sin histamina, más 3 desviaciones típicas).

Límite de la cuantificación: 2.5 ppm (descrito como el punto de concentración más bajo de la curva de calibración en que este análisis puede detectar confiablemente la histamina).

Intervalo de la cuantificación: 2.5 - 40 ppm (para asegurar un rendimiento óptimo, los resultados superiores a 40 ppm requieren una disolución adicional; véase "Disolución del extracto de la muestra" para obtener más instrucciones.)

Matrices validadas: atún en aceite o al natural*, dorado, anjova y carne de pescado; todos ellos frescos, enlatados o embolsados.

*Matriz validada *AOAC-RI*

SERVICIO AL CLIENTE

Puede acceder al Servicio Técnico y de Asistencia al Cliente de Neogen entre las 8:00 de la mañana y las 6:00 de la tarde (hora del Este de los EE.UU.); llame a los números 800-234-5333 ó 517-372-9200 y pida hablar con un representante de ventas o con los Servicios Técnicos. Puede obtener asistencia las 24 horas del día, llamando al 800-867-0308. Se puede recibir capacitación sobre este producto, al igual que sobre todos los equipos de análisis de Neogen.

INFORMACIÓN DISPONIBLE SOBRE FICHAS DE SEGURIDAD DE LOS MATERIALES

Puede obtener fichas de seguridad de los materiales para este equipo analítico y para todos los equipos analíticos Neogen de seguridad de los alimentos en www.neogen.com, o llamando a los números 800-234-5333 ó 517-372-9200.

GARANTÍA

Neogen Corporation no ofrece garantía de ninguna especie, explícita o implícita, salvo la de que los materiales utilizados en sus productos son de calidad satisfactoria. Si algún material es defectuoso, Neogen facilitará un producto sustitutivo. El comprador asume todo el riesgo y toda la responsabilidad dimanantes del uso de este producto. No hay garantía de comerciabilidad de este producto, ni de la adecuación del mismo a ningún propósito. Neogen no se hace responsable de ningún daño, con inclusión de daños especiales o consecuentes, ni de gastos derivados directa o indirectamente del uso de este producto.

EQUIPOS ANALÍTICOS DISPONIBLES EN NEOGEN

Toxinas naturales
- Aflatoxina, Deoxinivalenol (DON), Ocratoxina, Zearalenona, Toxina T-2, Fumonisina, Histamina

Bacterias presentes en los alimentos
- *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*

Saneamiento
- Trifosfato de Adenosina (ATP) siglas en Inglés, Levadura y Moho, Contado Total de Platos, *E. coli* genérica, Coliformas Totales, Residuos Proteicos

Alérgenos alimentarios
- Cacahuetes, Leche, Huevos, Almendras, Gluten, Soja, Avellana

Modificación genética
- CP4 (Roundup Ready®)

Subproductos para rumiantes
- Harina de carne y huesos, piensos

NEOGEN CORPORATION

620 Lesher Place, Lansing, MI 48912
800/234-5333 (EE.UU./Canadá) o 517/372-9200 • fax: 517/372-2006
correo electrónico: foodsafety@neogen.com • www.neogen.com

16004D V-Hist-ENSP_0309

Anexo 4.- Valores de absorbancia de los patrones por cada día de análisis.

Lecturas de los patrones del kit, por día de análisis.

Concentración estándar en ppm	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia 4	Absorbancia 5	Absorbancia 6	Absorbancia 7	Absorbancia 8	Promedio
0	2,464	2,453	2,475	2,484	2,456	2,475	2,464	2,453	**2,476**
2,5	1,686	1,654	2,690	1,684	1,657	2,694	1,686	1,654	**2,680**
10	1,253	1,335	1,276	1,252	1,257	1,271	1,253	1,335	**1,256**
20	0,803	0,812	0,811	0,807	0,813	0,803	0,806	0,801	**0,805**
50	0,580	0,537	0,581	0,587	0,534	0,584	0,580	0,537	**0,583**

La tabla recolecta los datos de las lecturas de los patrones del kit VERATOX®, en cada día del análisis se corrió los patrones, de los cuales se obtuvieron un promedio para grafica de la curva.

Anexo 5. Valores en ppm de histamina, por cada puesto de muestreo, bajo la totalidad de muestras analizadas.

	Valores en ppm de histamina promedio por puesto de muestreo.							
PUESTO DE MUESTREO	SEMANA 1		SEMANA 2		SEMANA 3		SEMANA 4	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Puesto N° 1	18,33	24,9	38,58	19,56	34,96	29,65	17,33	26,73
Puesto N° 2	54,85	62,93	50,36	62,9	38,26	46,56	72,05	60,43
Puesto N° 3	49,21	68,11	38,05	47,26	35,08	30,36	36,76	36,73
Puesto N° 4	31,55	17,7	32,61	25,58	45,71	29,81	33,68	38,45
Puesto N° 5	68,28	40,55	95,86	48,23	42,45	32,20	46,03	40,08
Puesto N° 6	28,85	33,91	23,41	28,85	24,38	22,46	19,25	25,75
Puesto N° 7	19,75	30,65	30,65	22,98	24,86	28,06	28,68	31,43
Puesto N° 8	33,25	24,73	24,73	40,75	24,01	29,43	34,51	14,43

La tabla recolecta datos de los promedios de las lecturas de todas las muestras obtenidas en cada uno de los ocho puestos de muestreos, indicando el día de la toma y análisis de las muestras como día 1 y día 2.