

DETERMINACIÓN DE HISTAMINA POR EL MÉTODO DE ELISA EN PESCADO FRESCO COMERCIALIZADO EN EL MERCADO MUNICIPAL “EL ARENAL” DE LA CIUDAD DE CUENCA

Determination of Histamine by the ELISA Method in Fresh Fish Sold in the Municipal Market "El Arenal" of the Cuenca City

Gabriela Alexandra Arciniega Alvarado

Instituto Tecnológico Superior Beatriz Cueva de Ayora, Ecuador

gabrielarciniega86@hotmail.com

RESUMEN

La histamina es una toxina, perteneciente al grupo de las aminas biógenas producida por una gran diversidad de bacterias que contaminan principalmente la carne de pescado, por falta de higiene en la manipulación e inadecuada conservación del pescado. El consumo de alimentos contaminados con histamina provoca a las personas una intoxicación alimentaria que puede llegar hasta la muerte. Por tanto, se determinó la concentración de Histamina en 210 muestras de pescado fresco; utilizó el kit Veratox® por el método de ELISA; las cuales provienen de 10 puestos de venta del mercado municipal “El Arenal” en la ciudad de Cuenca y de 7 especies de pescado (bagre, albacora, camotillo, corvina, tiburón, tilapia y chinito) por lugar de expendio. La recolección se efectuó en 3 muestreos con intervalos de tiempo de 15 días, para lo cual se obtuvo que el 50% de las muestras recolectadas se encuentran dentro del límite de control establecido por la FDA que es ≤ 17 ppm. Además se pudo evidenciar con un intervalo de confianza del 95% de que no existen diferencias significativas entre los puestos de venta de pescado. Sin embargo se presentaron valores atípicos representados específicamente por la especie de albacora, ya que su alto contenido en histidina libre ha sido susceptible a las falencias presentes en la manipulación y conservación como se pudo observar y además constatar a través de la medición de la Temperatura; la cual osciló de 9,5 a 11,0 °C para los 3 muestreos realizados.

Finalmente se ha elaborado un manual que se basa en la medida de prevención eficiente para impedir la formación de histamina en el producto desde la captura y durante todas las etapas de transporte y comercialización.

Palabras Claves: Histamina, Aminas Biógenas, Histidina, Intoxicación.

ABSTRACT

Histamine is a toxin, belonging to the group of biogenic amines produced by a wide variety of bacteria that contaminate meat mainly fish, for lack of hygiene and inadequate handling fish conservation. Consumption of food contaminated with histamine causes people food poisoning that can lead to death. Therefore, the concentration of histamine in 210 samples of fresh fish was determined; Veratox® used the kit by the ELISA method; which come 10 stalls in the municipal market "El Arenal" in the city of Cuenca and 7 species of fish (catfish, albacore, camotillo, sea bass, shark, tilapia and chinito) by place of sale. The collection was carried out on 3 samples at time intervals of 15 days, which was obtained that 50% of the collected samples are within the control limit set by the FDA is ≤ 17 ppm. In addition it was evident with a confidence interval of 95% that there are no significant differences between fish stalls. However outliers specifically represented by the species of albacore were presented as their high content of free histidine has been susceptible to the shortcomings present in the handling and storage as was observed and also confirm through measuring the temperature; which ranged from 9,5 to 11,0 °C for three samplings.

Finally it has developed a manual based on effective prevention measure to prevent the formation of histamine in the product from harvest and during all stages of transport and marketing.

Key Words: Histamine, Biogenic Amines, Histidine Intoxication.

INTRODUCCIÓN

La histamina es una biotoxina que se forma a partir de la descarboxilación de histidina, un aminoácido presente en concentraciones elevadas principalmente en el tejido muscular de los peces de la familia *scombridae* y *no scombridae*. Este proceso se origina por la acción de determinadas bacterias que se encuentran en el intestino del pescado, aprovechan las concentraciones de histidina para producir la histamina. Las bacterias productoras de histamina son ciertas *Enterobacterias*, *Vibrios* y *Lactobacilos*. Estas bacterias pueden encontrarse en la mayoría de los pescados, probablemente como resultado de una contaminación post captura. Se desarrollan bien a 10 °C, pero a 5 °C el desarrollo se retarda considerablemente. (Gómez C, 2014)

La escombroidosis es una intoxicación química dada por histamina y causada por la ingestión de alimentos entre ellos los peces con altos contenidos de histidina, los cuales no fueron tratados con óptimas condiciones de conservación, el pescado fresco contiene cerca de 1mg/100gr de histamina y los peces afectados contienen cerca de 20mg/100gr de histamina llegando a encontrar en algunos casos de hasta casi 400 mg/100gr de histamina. Las intoxicaciones pueden ser importantes e incluso fatales si no son tratadas a tiempo. (Field & Calderón, 2008)

El riesgo a padecer de una intoxicación por histamina lo tiene cualquier persona, no solo aquellas que se alimenten de peces de zonas cálidas y templadas. Los niveles de histamina dañinos para el hombre varían, según la comunidad Europea son 100 mg /100gr de histamina en el pescado y según la FDA son 50 mg /100gr como nivel de intervención por razón de riesgos y de 10 a 20 mg /100g como indicador de manipulación deficiente del pescado (Huss, H., 1999). Lo que es claro que cualquier porcentaje de histamina superior al que contienen normalmente los peces ya causa alteraciones en la salud de los consumidores (Field & Calderón, 2008). Debe recalcarse que una vez producida la histamina en el pescado, el riesgo de que se provoque la intoxicación a quien lo consume es muy alto. La histamina es muy resistente al calor, y aunque el pescado se haya cocido, enlatado o haya sido sometido a cualquier otro tratamiento térmico antes de su consumo, la histamina no se destruye. (Gómez C, 2014)

Para contribuir en la concientización de la manipulación del pescado en buenas condiciones, se ha realizado un estudio acerca de la cuantificación del nivel de histamina en pescado fresco

proveniente del mercado municipal “El Arenal”, en donde se ha constatado la falta de conocimiento acerca de las buenas prácticas de manipulación y de seguridad alimentaria.

El objetivo del presente estudio fue determinar el nivel de Histamina por el método de ELISA, en diferentes tipos de pescado fresco, que se expenden en el mercado municipal “El Arenal” de la ciudad de Cuenca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Estudio. Para la presente investigación, se determinó el contenido de Histamina en diferentes tipos de pescado fresco que se expenden en el mercado “El Arenal” que está situado en el sector de la Av. de las Américas, entre las calles Eduardo Arias y Roberto Crespo, perteneciente a la parroquia el Batán, de la ciudad de Cuenca.

Muestreo. Como resultado de un muestreo aleatorio representativo, las muestras analizadas se recolectaron de 10 puestos de venta de pescado, de un total de 25 situados en el centro comercial antes mencionado. Las muestras fueron tomadas por tres ocasiones, cada 15 días en horas de la mañana, con un número representativo de 210 muestras en total, las cuales fueron transportadas en cajas tecnopor (cooler) a temperaturas bajas y debidamente etiquetadas, para luego ser analizadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

El muestreo que se realizó para este estudio, está basado en el Reglamento de la FDA: “*Fish & Fishery products. Hazards & Controls Guidance*”, el cual hace referencia a los productos de la pesca procedentes de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina; en donde establece que se deben tomar un número de 3 muestras por lote, en donde se podría decir que para este caso sería por lugar de expendio del producto en estudio (10 puestos) y en 7 especies diferentes de pescado (bagre, albacora, camotillo, corvina, tiburón, tilapia y chinito); a los cuales se los ha seleccionado por la frecuencia de disponibilidad de la especie y de la preferencia por parte de los consumidores.

Metodología del manejo de las muestras en el laboratorio. Se recolecta la muestra a la altura del lomo de 4 dedos antes de la base de la cabeza, se corta aproximadamente 50 gramos por cada pescado y se identifica para ser analizada. La determinación de Histamina en el

pescado, se realizó a través del Método de ELISA, cuyo kit está especialmente diseñado para realizar un análisis cuantitativo de Histamina en especies de pescado azul como el atún, y las harinas de pescado. Este sistema es un inmunoensayo tipo ELISA competitivo directo con un rango de cuantificación de 2.5 a 50 partes por millón (ppm) en tan solo 20 minutos de análisis. La extracción de la Histamina para su valoración, se realiza por un sencillo procedimiento con agua. El Kit se suministra con todos los reactivos necesarios para su realización. Al ser un test cuantitativo, aunque visualmente se pueda tener una idea del resultado, es necesario el uso de un lector de ELISA para poder cuantificar correctamente. (Vargas, 2006)

Interpretación de Resultados. El lector de ELISA calculará con las absorbancias obtenidas de los cinco controles la recta de regresión. A partir de aquí, los valores de las muestras serán introducidos. (Vargas, P., 2006).

Análisis de Resultados. En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de las variables. Los resultados obtenidos se representaron por medio de gráficas de control de calidad, histogramas, diagrama de cajas y gráfico de barras. Adicionalmente, para determinar las diferencias significativas entre los niveles de histamina que contiene el pescado en cuestión entre un puesto de expendio a otro, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor comparando los niveles de histamina con un nivel de significancia del 5% ($p < 0,05$), el cual fue realizado a través del programa estadístico IBM SPSS Statistics 22.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como es de nuestro interés analizar la diferencia de medias entre los valores obtenidos a partir de los tres muestreos realizados con variabilidad de tiempo considerable (cada 15 días) de cada uno de los lugares de expendio de las diferentes especies de pescado; se ha determinado el promedio a más de sus respectivos estadísticos de cada uno de estos para proseguir a su referido análisis.

Tabla I. Contenido de Histamina de los 10 Puestos de Venta en los Tres Muestreos (*)

| Puestos de Venta | M1 | M2 | M3 | $\mu \pm S$ |
|------------------|-------------------|-------------|-------------|-------------------|
| P1 | 1,8 ± 3,4 | 1,9 ± 4,4 | 2,4 ± 5,0 | 2,0 ± 0,3 |
| P2 | 9,8 ± 19,6 | 2,0 ± 2,8 | 14,2 ± 31,8 | 8,7 ± 6,2 |
| P3 | 18,6 ± 36,8 | 4,2 ± 5,7 | 18,7 ± 34,8 | 13,8 ± 8,3 |
| P4 | 13,9 ± 26,5 | 5,4 ± 5,5 | 17,7 ± 30,6 | 12,3 ± 6,3 |
| P5 | 25,0 ± 32,6 | 7,7 ± 8,8 | 23,8 ± 29,9 | 18,8 ± 9,7 |
| P6 | 33889,8 ± 89509,8 | 53,6 ± 61,9 | 70,8 ± 65,9 | 11338,1 ± 19530,4 |
| P7 | 48,1 ± 85,5 | 17,8 ± 35,1 | 12,0 ± 13,7 | 26,0 ± 19,4 |
| P8 | 18,9 ± 31,9 | 17,1 ± 33,1 | 18,1 ± 30,2 | 18,0 ± 0,9 |
| P9 | 17,8 ± 29,0 | 16,4 ± 24,6 | 15,3 ± 26,0 | 16,5 ± 1,3 |
| P10 | 1445,8 ± 3774,9 | 16,9 ± 32,1 | 11,1 ± 14,5 | 491,3 ± 826,7 |

*Promedio y desviación estándar de los 3 muestreos.

Además se utilizó μ para representar la media del grupo i , para lo cual se debe docimar la siguiente hipótesis:

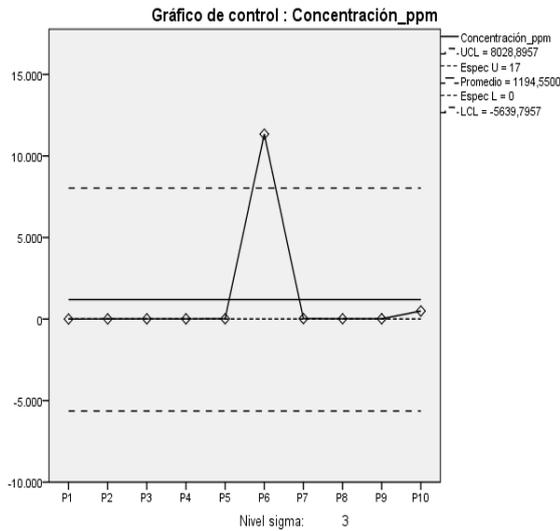
$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$$

H_1 : al menos una media es diferente

Tabla II. ANOVA de un factor. Comparación de Niveles de Histamina por Puesto de Venta de Pescado. Concentración_ppm

| | Suma de cuadrados | Gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-------|-------------------|----|------------------|----|------|
| EG | 343576713,4 | 9 | 38175190,3 | ,9 | ,472 |
| DG | 764239118,2 | 20 | 38211955,9 | | |
| Total | 1107815831,6 | | | | |

Adicionalmente, se ha determinado la proporción de muestras pertenecientes al conjunto de los tres muestreos analizados que se encuentran dentro y fuera del rango señalado por la FDA (0 – 17 ppm) de histamina, en donde se puede establecer a través del estadístico del proceso arrojado que el 50% se encuentra fuera del mismo y por diferencia el otro 50% cumple con la regulación antes mencionada.



Estadísticas de proceso
 Act. % fuera de SL **50,0%**
 LSL = 0 y USL = 17.

Además, con el fin de dar más adelante una mejor interpretación de los resultados del estudio se ha determinado también la alta concentración de datos según el tipo de especie para tratar de dar una conclusión más descriptiva de la población estadística.

Tabla III. Concentración de Histamina por Especie de Pescado

| Especie de Pescado | Concentración (ppm) |
|--------------------|---------------------|
| Bagre | 8,42 ± 10,46 |
| Tilapia | 10,43 ± 8,39 |
| Albacora | 8257,81 ± 24884,11 |
| Tiburón | 16,30 ± 18,82 |
| Chinito | 24,15 ± 46,23 |
| Corvina | 39,20 ± 38,63 |
| Camotillo | < 2,00 |

En vista de observar la existencia de un alto nivel de histamina en la especie de Albacora se ha elaborado una representación gráfica con respecto a la influencia de la Temperatura (°C) en la Concentración de Histamina (ppm).

Tabla IV. Influencia de la Temperatura (°C) en la Concentración de Histamina (ppm) que contiene la especie de Albacora para cada Muestreo.

| Muestruos | Concentración de Histamina (ppm) | Temperatura (°C) |
|-----------|----------------------------------|------------------|
| M1 | 24752,1 | 11,0 |
| M2 | 25,4 | 9,0 |
| M3 | 22,3 | 9,5 |

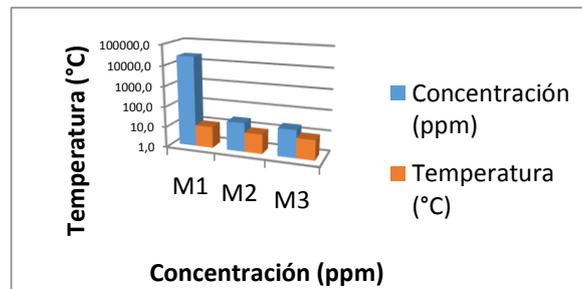


Figura II. Gráfica de Barras para la Representación de la Temperatura en los Tres Muestreos para la especie de Albacora.

CONCLUSIONES

El 50% de las muestras analizadas, que constituyen pescado fresco comercializado en el mercado municipal “EL Arenal”, evidenciaron que se encuentran dentro de los límites permitidos por la FDA que es de ≤ 17 ppm.

Al realizar el análisis de varianza ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, se determinó que no existen diferencias significativas entre los 10 puestos de expendio de pescado al no poder rechazar la hipótesis de igualdad de medias, ya que se obtuvo un nivel de significancia mayor a 0,05.

El pez Albacora (*Thunnus alalunga*), presentó la concentración más alta de histamina en los 10 puestos de venta durante los tres muestreos realizados. Además los valores obtenidos después de un análisis estadístico de las variables como la Temperatura y la Concentración mostraron una correlación positiva debido a que la influencia de la primera aumenta a la segunda; es decir a mayor temperatura, mayor nivel de histamina; para lo cual se explica que por pertenecer a la familia Escómbridos, contiene un alto contenido de histidina libre que junto con las malas condiciones presentes en su manipulación y conservación anteriormente mencionadas han provocado la descarboxilación del aminoácido y consecuentemente la formación de un alto nivel de histamina.

Finalmente, se puede decir que los resultados obtenidos permiten concluir que las condiciones de almacenamiento, manipulación y exposición de pescado en el establecimiento comercial demuestran serias falencias, ya que la producción de histamina fue más evidente a una Temperatura por encima de los 10°C.

Por tanto se elaboró un Manual con el fin de crear conciencia en los vendedores acerca del riesgo que existe brindar un producto peligroso para la salud del consumidor, a más de capacitarlos específicamente acerca de la manipulación del pescado ya que la determinación de histamina solamente se puede detectar a través de un procedimiento químico, debido a que el pescado puede contener niveles tóxicos de histamina sin presentar ninguno de los parámetros sensoriales que habitualmente caracterizan la descomposición como indicador de dicha contaminación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Al Bulushi I, Poole S, Deeth HC y Dykes GA. (2009). Biogenic Amines in Fish: Roles in Intoxication, Spoilage, & Nitrosamine Formation — A Review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 49 (4): 369–377.
- [2] Avdalov Nathan, N. (2014). Manual de Manipulación de los Productos Pesqueros de la Pesca Artesanal. Montevideo: DINARA – INFOPECA. (Promoción del Consumo de Pescado; 36 P.
- [3] Avdalov Nathan, N. (2009). Manual de Control de Calidad y Manipulación de Productos Pesqueros para Pescadores y Procesadores Artesanales. Proyecto CFC/FAO/INFOPECA, FSCFT 23, “Mejoramiento de la Pesca Artesanal en Centro América, México y el Caribe”.
- [4] BENNOUR, M. et. al (1991). M. Chemical and microbiological assessments of Mackerel (*Scomber scombrus*) store in Ice. *J. Food Prot.* 54:789-792. 1991.
- [5] CGG. (2015). Manual de Buenas Prácticas de Manejo y Aseguramiento de la Calidad de Productos Pesqueros. Consejo del Gobierno del Régimen Especial de Galápagos. Galápagos (Ecuador).
- [6] Elika. (2013). *Histamina. Elika*. Retrieved 3 July 2016, from http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento100/13.Histamina.pdf.
- [7] Cervantes, P. (2009). *Digestión Metabolismo De Proteínas y Aminoácidos*. *Es.slideshare.net*. Retrieved 4 July 2016, from <http://es.slideshare.net/Paulknew/digestion-metabolismo-de-proteinas-y-aminoacidos>.
- [8] FAO. (2011). Manual de Control de Calidad de los Productos de la Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Lima (Perú).

- [9] Fernández, J. (2002). Control de la Producción de Histamina durante el deterioro del Pescado (pp. 1-10). Lima: Universidad La Molina. Retrieved from <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~leojeri/control%20histamina%20pescado.doc>.
- [10] Field, J. & Calderón, R. (2008). Escombroidosis, Intoxicación por Histamina. *Medigraphic Artemisa*, (25), 41 - 49. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/bolclinhosinfson/bis-2008/bis082i.pdf>
- [11] Fish & Fishery Products Hazards & Controls Guidance [Orientación de controles y peligros de los productos pesqueros y piscícolas]. (2011). 4th ed. [ebook] E.E.U.U. Available at: https://www.flseagrant.org/wp-content/uploads/SGR_131_Spanish_FDA_Guide_web.pdf [Accessed 2 Oct. 2015].
- [12] Gómez, César. (2016). "Determinación de los niveles de la Biotoxina Histamina en la Carne de Pescado Dorado (*Coryphaena Hippurus*) de Venta en Tres Mercados Municipales de La Ciudad de Guatemala". Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. Print.
- [13] González, A. (2008). Intoxicación Histamínica o Escombroidosis en Pescado. *16 DE ABRIL*, (219). Retrieved from <http://www.16deabril.sld.cu/rev/219/articulo2.html>
- [14] Gozzi, M., Piacente, M., Cruces, V., & Díaz, E. (2011). Influencia de la Temperatura de Conservación sobre la Formación de Histamina en Caballa (*Scomber japonicus*). *Información Tecnológica*, 22(6), 53-62. <http://dx.doi.org/10.4067/s0718-07642011000600006>.
- [15] Hernández Garcíarena, I. and S. Suarez Tamayo. "Contenido De Histamina En Pescados Y Productos Pesqueros. Efectos De La Vigilancia En El Período 2010-2014". *La Industria Cárnica Latinoamericana Inocuidad* 192 (2015): 62. Web. 24 May 2016.
- [16] Izquierdo, P., S&rea, L., Allara, M., González, P., García, A., & Valecillos, Y. (2004). Evaluación Bacteriológica y Contenido de Histamina en Pescado Desmenuzado Precocido en Venezuela. *Revista Científica Redalyc*. Retrieved 30 October 2015, from <http://www.redalyc.org/pdf/959/95914513.pdf>.
- [17] Riesco, M. (2008). Cuando el pescado no recibe refrigeración adecuada: Intoxicación por histamina. *SEA GRANT*, 64. Retrieved from http://seagrantpr.org/v2/wp-content/uploads/2014/11/facts_64.pdf
- [18] Rossano, R, et. al. (2006). Influence of storage Temperature and freezing Time on Histamine level in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (L., 1758): A study by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 830:161-164.

- [19] Smajlovic, A. et. al. (2009). "Identification of Histamine Content In Fish Samples". *Scientific and Professional Paper* 10: 3. Web. 24 May 2016.
- [20] Teixeira Mársico, Eliane et al. (2010). "Evaluación Del Contenido De Histamina En Atún (*Thunnus Sp*) "In Natura" y en Sashimi procesado a partir de esta Materia Prima". *Avances en Ciencias Veterinarias* 16.1-2: n. pag. Web.
- [21] Vargas, P. (2006). *VERATOX® for HISTAMINE de Neogen Corp.*. [online] Neogen Corp. Available at:
http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Veratox_histamina.pdf [Accessed 18 Aug. 2015].