



DEPARTAMENTO DE POSGRADOS
MAESTRÍA EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y
SEGURIDAD ALIMENTARIA

***“Determinación de Histamina por el método de ELISA en
pescado fresco comercializado en el mercado municipal “EL
ARENAL” de la ciudad de Cuenca”***

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
“MAGÍSTER EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA”**

AUTOR: ING. GABRIELA ALEXANDRA ARCINIEGA ALVARADO

DIRECTOR: MGST. DIANA CATALINA CHALCO QUEZADA

CUENCA, ECUADOR

2016

DEDICATORIA

A mis padres quienes siempre me han brindado su apoyo incondicional.

A mi hijo, que es el motor de mi vida.

A mis amigos quienes me han ayudado en todo momento que he necesitado de ellos.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Diana Chalco, por guiarme en todo el arduo proceso para llevar a cabo con éxito el presente estudio.

A todo el personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay, que han sabido brindarme una especial acogida y ayuda durante la realización de la parte experimental del trabajo.

A la Ing. Alexandra Cerezo, Gerente de Ventas de la Región Sur de APRACOM S.A.; quien a más de proveer equipos y materiales para el estudio, me ha brindado su ayuda en cada momento que se le ha solicitado.

A la Ing. Susana Patiño, colega y gran amiga; quien me ha colaborado incondicionalmente con el procedimiento del trabajo de laboratorio del estudio realizado.

RESUMEN

El presente estudio tiene como finalidad determinar la concentración de Histamina en diferentes especies de pescado fresco, provenientes del mercado municipal “El Arenal” de la ciudad de Cuenca; utilizando para su análisis el kit Veratox® por el método de ELISA. Concluyéndose luego del estudio, 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.

Finalmente se elaboró un manual que se ha basado en las medidas de prevención eficientes para impedir la formación de histamina en el producto, durante todas las etapas de transporte y comercialización.

PALABRAS CLAVES: Histamina, Aminas Biógenas, Histidina, Intoxicación.

ABSTRACT

This study aims to determine the concentration of Histamine in different species of fresh fish from "El Arenal" municipal market of the city of Cuenca. The Veratox® test kit by ELISA method was used for the analysis. After the study, it was concluded that 50% of the collected samples are within the control limit set by the FDA, which is ≤ 17 ppm. Furthermore, with a confidence interval of 95%, it was evident that there were no significant differences among the fish stalls. Finally, a manual based on effective prevention measures so as to avoid the formation of histamine in the product during all stages of transport and marketing was developed.

KEYWORDS: Histamine, Biogenic Amines, Histidine, Intoxication.



Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

INDICE DE CONTENIDO

Contenido

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
CAPÍTULO I	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
1.1 Localización del Estudio.....	10
1.2 Muestreo:	10
1.3 <i>Metodología del manejo de las muestras en el laboratorio.</i>	10
1.4 Procedimiento	11
1.4.1 Extracción de la muestra.....	11
1.4.2 Dilución del extracto	11
1.4.3 Realización del test	12
1.4.4 Interpretación de Resultados	14
1.4.5 Análisis de Resultados	15
CAPÍTULO II	16
RESULTADOS.....	16
2.1 Resultados para la Curva de Calibración para el Primer Muestreo.....	16
2.1.1 Resultado de Cuantificación de Histamina para cada una de las Muestras tomadas en el Primer Muestreo.....	17
2.2 Resultados para la Curva de Calibración para el Segundo Muestreo.....	19

2.2.1	Resultado de Cuantificación de Histamina para cada una de las muestras tomadas en el Segundo Muestreo.	20
2.3	Resultados para la Curva de Calibración para el Tercer Muestreo.	21
2.3.1	Resultado de Cuantificación de Histamina para cada una de las muestras tomadas en el Tercer Muestreo.	22
CAPÍTULO III		32
DISCUSIÓN		32
CAPÍTULO IV		36
CONCLUSIONES		36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		37
ANEXOS		40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura Química de la Histamina	2
Figura 2. El concepto de la enfermedad de la histaminosis inducida por los alimentos.....	3
Figura 3. Curva de Calibración del Primer Muestreo.....	16
Figura 4. Gráfica de Control de Calidad del Primer Muestreo	18
Figura 5. Curva de Calibración del Segundo Muestreo.....	19
Figura 6. Gráfica de Control de Calidad del Segundo Muestreo	21
Figura 7. Curva de Calibración del Tercer Muestreo.....	22
Figura 8. Gráfico de Control de Calidad del Tercer Muestreo.....	24
Figura 9. Representación gráfica de la Concentración de Histamina de los Tres Muestras.....	25
Figura 10. Gráfico de Control de Calidad de los Tres Muestras.....	28
Figura 11. Diagrama de Cajas para los Puestos de Venta de Pescado	29
Figura 12. Gráfica de Barras para la Concentración de Histamina para las Especies de Pescado	30...
	25
Figura 13. Gráfica de Dispersión para la Concentración de Histamina en Albacora	30
Figura 14. Gráfica de Barras para la Representación de la Temperatura en los Tres Muestras	31

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de absorbancia de las concentraciones estándar del Kit Veratox®, lectura a 650 nm en el Primer Muestreo.....	16
Tabla 2. Análisis cuantitativo del nivel de Histamina del Primer Muestreo con su respectiva Temperatura.....	17
Tabla 3. Estadísticos descriptivos del Primer Muestreo	18
Tabla 4. Resultados de absorbancia de las concentraciones estándar del Kit Veratox®, lectura a 650 nm en el Segundo Muestreo.....	19
Tabla 5. Análisis cuantitativo del nivel de Histamina del Segundo Muestreo con su respectiva Temperatura.....	20
Tabla 6. Estadísticos descriptivos del Segundo Muestreo	20
Tabla 7. Resultados de absorbancia de las concentraciones estándar del Kit Veratox®, lectura a 650 nm en el Tercer Muestreo.....	21
Tabla 8. Análisis cuantitativo del nivel de Histamina del Tercer Muestreo con su respectiva Temperatura.....	23
Tabla 9. Estadísticos descriptivos del Tercer Muestreo	23
Tabla 10. Contenido de Histamina de los 10 Puestos de Venta en los Tres Muestreos	25
Tabla 11. Estadísticos Descriptivos de los 10 Puestos de Venta en los Tres Muestreos	25

Tabla 12. Estadísticos descriptivos. Comparación de Niveles de Histamina por Puesto de Venta de Pescado 27

Tabla 13. ANOVA de un factor. Comparación de Niveles de Histamina por Puesto de Venta de Pescado 27

Tabla 14. Concentración de Histamina por Especie de Pescado 29

Arciniega Alvarado Gabriela Alexandra

Trabajo de Graduación

Dra. Diana Catalina Chalco Quezada Mgst.

Mayo, 2016

“Determinación de Histamina por el método de ELISA en pescado fresco comercializado en el mercado municipal “EL ARENAL” de la ciudad de Cuenca”

INTRODUCCIÓN

La intoxicación por histamina es una intoxicación química debida a la ingestión de alimentos que contienen altos niveles de histamina. Históricamente, esta intoxicación se denominó intoxicación por escómbridos debido a la frecuente asociación con peces de la Familia *Scombridae*, entre los que se incluyen el atún y la macarela o caballa.

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 algunos peces. La intoxicación es un problema de alcance mundial en los países donde los consumidores ingieren pescado que contiene altos niveles de histamina.

Como se muestra en la *Figura 1*, la histamina se forma en el pescado *post mortem* por descarboxilación bacteriana del aminoácido histidina. Frecuentemente, los pescados afectados son aquéllos con un alto contenido natural de histidina, como los pertenecientes a la familia *Scombridae*, aunque también pescados distintos a los escómbridos como los de la familia *Clupeidae* y el mahi-mahi (dorado), pueden provocar la intoxicación por histamina.

Las bacterias productoras de histamina son ciertas *Enterobacteriaceae*, algunos *Vibrio* sp., y unos pocos *Clostridium* y *Lactobacillus* sp. Las productoras más potentes de histamina son *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Hafnia alvei*. Estas bacterias pueden encontrarse en la mayoría de los pescados, probablemente como resultado de una contaminación postcaptura. Se desarrollan bien a 10 °C, pero a 5 °C el desarrollo se retarda considerablemente. *M. morganii* no produce histamina cuando las temperaturas eran en todo momento < 5 °C. No obstante, *M. morganii* producía grandes cantidades de histamina a bajas temperaturas (0–5 °C) después de estar 24 horas almacenada a altas temperaturas (10–25 °C), si bien a 5 °C o por debajo no hubo proliferación bacteriana.

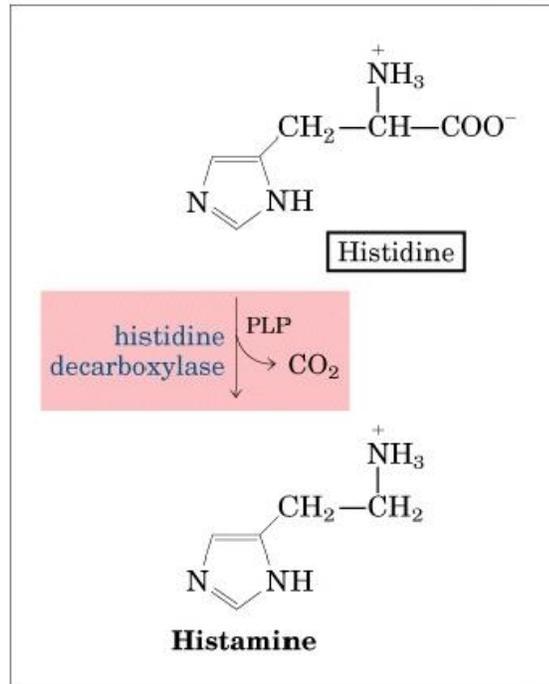


Figura 1. Estructura Química de la Histamina (Cervantes, 2009)

La principal bacteria productora de histamina, *M. morgani*, se desarrolla mejor a pH neutro. No obstante, puede desarrollarse en un rango de pH entre 4,7 y 8,1. Este microorganismo no es muy resistente al NaCl, pero si el resto de las condiciones son óptimas la proliferación puede producirse hasta con un 5 por ciento de NaCl. Por lo tanto, la producción de histamina por este organismo es sólo un problema en productos pesqueros muy ligeramente salados.

Debe recalcar que una vez producida la histamina en el pescado, el riesgo de que se provoque la enfermedad 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.

La prueba de que la histamina cause o no la enfermedad es muchas veces circunstancial. Se han encontrado de forma coherente niveles altos de histamina en muestras relacionadas con brotes, y los síntomas observados en los brotes son semejantes a los de la histamina como agente causante. No obstante, una ingestión alta de histamina no siempre causa la enfermedad, incluso cuando se excede el “nivel de intervención por riesgo” (50 mg/1000 g para el atún).

El cuerpo humano tolera una cierta cantidad de histamina sin ninguna reacción. La histamina ingerida será detoxificada en el tracto intestinal por al menos 2 enzimas, la diamina oxidasa

(DAO) y la histamina N-metiltransferasa (HMT). Este mecanismo de protección puede eliminarse si la ingestión de histamina y/o otras aminas biógenas es muy alta, o si las enzimas son bloqueadas por otros compuestos como se muestra en la *Figura 2*.

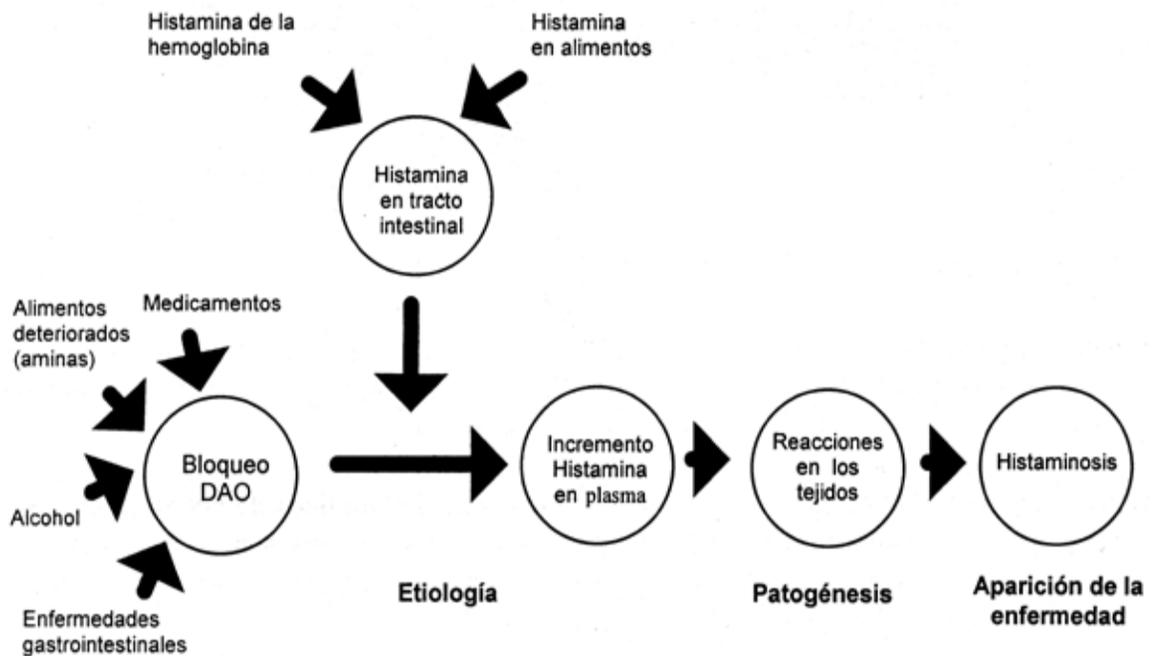


Figura 2. El concepto de la enfermedad de la histaminosis inducida por los alimentos (González, 2008)

Otras aminas biógenas como la cadaverina y la putrescina, que se sabe están presentes en el pescado deteriorado, pueden actuar como potenciadores de la toxicidad de la histamina. Presumiblemente, la inhibición del catabolismo intestinal de la histamina causará un mayor transporte de la histamina a través de las membranas celulares y en la circulación sanguínea.

La medida preventiva más eficaz es una baja temperatura de preservación y almacenamiento de los productos de la pesca en todo momento. Todos los estudios parecen estar de acuerdo en que el almacenamiento a 0 °C, o muy cerca de 0°C, limita la formación de histamina en el pescado a niveles insignificantes. (González, 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. Para asegurar la inocuidad, la regulación 2073/2005 de la Comisión Europea (Commission regulation, EC) establece como niveles máximos para las especies de pescados ricos en histidina un valor medio, calculado sobre nueve muestras, no mayor a 100 ppm de histamina, ninguna de las cuales debe exceder

200 ppm. Las pautas señaladas en Estados Unidos por la Administración de Drogas y Medicamentos (FDA/2001) fijan una concentración máxima de histamina, considerando que no se distribuye uniformemente en el pescado, de 50 ppm. La mayoría de las especies relacionadas con la intoxicación ha evidenciado valores de histidina libre mayores a 1000 ppm (Hungerford, 2010). Si se considera la estimación de toxicidad de la histamina de 500 ppm señalada por la FDA, una ingestión de 300 g de pescado alterado susceptible de provocarla correspondería a 150 mg de histamina, que en un individuo de 70 kg supone una concentración de 2,1mg/kg peso corporal. En personas con intolerancia a la histamina debida a causas genéticas, patológicas o farmacológicas, la cantidad tolerable puede ser mucho menor (Gozzi, Piacente, Cruces, & Díaz, 2011). 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).

Además debe recalcar 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)

Enrojecimiento e inflamación en los ojos, picor en la piel, hormigueo y sabor metálico en la boca y en los labios, son los síntomas de intoxicación; y si se ha experimentado alguno de estos síntomas luego de consumir pescado marino y si se cree que esto significa que una persona es alérgica a estos alimentos se puede estar equivocado. Probablemente, en vez de una alergia, haya sufrido una intoxicación o envenenamiento por histamina, sustancia que se encuentra asociada principalmente al consumo de algunos pescados cuya refrigeración ha sido inadecuada luego de su captura. El común denominador en los alimentos responsables de la intoxicación o del envenenamiento por histamina es que contienen niveles elevados de histamina y otros compuestos relacionados que se forman durante el proceso de descomposición de la carne y de los pescados. Los síntomas de este padecimiento, aunque incómodos, no duran, en la población en general, más de un día. La intoxicación por histamina es considerada una de las enfermedades más comunes en los pescados. Aun así muchos incidentes pasan desapercibidos y no son reportados a las agencias concernientes por falta de conocimiento de los profesionales de la salud o porque tienden a confundirse con otras condiciones, como por ejemplo, las alergias. La histamina regula varias funciones fisiológicas en el cuerpo y se produce principalmente en las células conocidas como mastocitos las cuales abundan en la piel, en la boca y en el tracto gastrointestinal y respiratorio. A pesar de que la histamina juega un papel clave en esta enfermedad y en las reacciones alérgicas, su mecanismo de acción es diferente. Cuando se es alérgico al pescado, el sistema inmunológico libera histamina al torrente sanguíneo luego de que la persona consume este alimento. El efecto

vasodilatador de la histamina es el responsable de los síntomas iniciales que aparecen. Cuando se consume una especie propensa a la formación de histamina y que ha sufrido abuso de temperatura, el sistema inmunológico no interviene. En este caso, el cuerpo reacciona a los niveles altos de histamina que se ingieren con el pescado. La histamina ingerida en la carne produce síntomas similares a los producidos durante una alergia. Cabe señalar que la histamina ingerida como parte de un pescado descompuesto es mucho más tóxica que una dosis equivalente de histamina administrada sola oralmente. Aparentemente, los otros productos que se forman durante la descomposición tornan al cuerpo más sensitivo a la intoxicación. Una diferencia entre esta intoxicación y las alergias es que los consumidores que la sufren no poseen historial de reacciones adversas a los pescados. Además, cuando ocurre; casi todas las personas que consumieron el pescado contaminado sufre el envenenamiento. Esto es difícil que suceda con las alergias.

Los pescados de carne roja, pertenecientes a la familia de los escómbridos, como por ejemplo, el dorado, el atún, la sierra el peto, cuya carne está deteriorada son las especies generalmente vinculadas a esta intoxicación. Esta es la razón por la cual es conocida también como intoxicación o envenenamiento escombroides. Sin embargo, este problema de salud puede también presentarse al ingerir pescados de carne blanca como los dorados, los jureles, las agujas, las sardinas y los arenques que no están tan frescos como quisiéramos y el pescado procesado como las anchoas enlatadas. Varias de las especies asociadas a este envenenamiento son capturadas por pescadores recreativos.

La intoxicación se produce al ingerir una sobredosis de histamina presente en las especies de pescados mencionados anteriormente, siempre y cuando éstas no hayan sido enfriadas rápida ni correctamente en cualquier momento luego de su captura. A su vez, estos niveles altos de histamina se producen en estas especies gracias a una enzima que se encuentra en ciertas bacterias marinas. Ésta degrada el aminoácido - histidina que está presente en mayor cantidad en la sangre de algunos peces marinos - y lo convierte en histamina. Las bacterias se encuentran en las agallas y en el sistema digestivo de los peces marinos. Al éstos morir, los mecanismos de defensa que mantienen a estas y a otras bacterias bajo control dejan de funcionar, de manera tal que se multiplican y comienzan a descomponer la carne y a producir histamina en aquellos peces propensos a su formación. Las bacterias crecen más activamente a temperaturas sobre 70 °F. Es interesante notar que la cocción inactiva a las bacterias responsables de la formación de histamina y a sus enzimas pero no a la histamina, mientras que la congelación sólo inactiva a las bacterias pero no afecta a las enzimas ni a la histamina. Esto significa que si se quiere prevenir esta intoxicación, se debe evitar a toda costa la formación de la histamina ya que una vez que esta sustancia se forma, no existe manera de

desactivarla. La histamina es estable al calor, la congelación, el salado, el ahumado y al proceso de enlatado.

Los síntomas iniciales (enrojecimiento y sudoración de la cara, sensación de quemazón, sabor a pimienta o a metal en la boca y en la garganta, mareo, vómitos, náusea y dolor de cabeza) son similares a los síntomas producidos por una reacción alérgica. Esto hace que en ocasiones el envenenamiento por histamina sea diagnosticado incorrectamente. Estos síntomas se presentan con rapidez, desde casi inmediatamente hasta dos horas después de consumirse el pescado en proceso de descomposición y pueden agudizarse y provocar erupciones en la cara y en el torso, urticaria, hinchazón, dolores abdominales y palpitaciones. En la mayoría de los pacientes estos síntomas son leves y se resuelven en pocas horas y sin tratamiento. Raras veces duran más de uno o dos días. En algunos casos, se hace necesario el uso de antihistamínicos o epinefrina. Cuando se sufre este tipo de intoxicación, los antihistamínicos administrados tienen una acción más rápida que en los casos de alergias alimentarias. En consumidores de edad avanzada o que toman medicamentos como izoniazida y doxiciclina, los cuales hacen más lenta la destrucción de la histamina en el hígado, los síntomas pueden ser más severos (inflamación en la lengua, problemas respiratorios visión borrosa) y/o tener mayor duración.

Los experimentos realizados muestran que la histamina puede alcanzar niveles tóxicos después de 6 a 12 horas del pescado haber estado sin refrigeración. Debido a que la formación de histamina en el pescado está íntimamente relacionada al crecimiento de ciertas bacterias durante el proceso de descomposición, la temperatura y el tiempo son dos factores que afectan directamente la formación de este compuesto químico. Entre más tiempo estos pescados estén expuestos a temperaturas altas, mayor es la posibilidad de que los niveles de histamina aumenten. (Riesco, 2008)

En los últimos años el pescado y los productos derivados de la pesca, han registrado un incremento en su consumo, debido principalmente al elevado valor nutritivo que estos poseen, ya que son ricos en proteínas (entre 15 y 17%), vitaminas liposolubles A, D y E, y su contenido en grasas es bajo, principalmente representado por ácidos grasos poliinsaturados, en particular, de la serie omega 3, que han sido relacionados con la prevención de enfermedades cardiovasculares. (Izquierdo et al., 2004)

Es importante entonces determinar la concentración de histamina en pescado debido al impacto que posee sobre su inocuidad y, por ende, sobre la salud humana. El método analítico oficial empleado en diferentes países y en la Comunidad Europea (directiva EU/2005) es la

cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Este procedimiento es costoso para muchas investigaciones y plantas procesadoras de productos pesqueros por lo que ha surgido interés en el desarrollo de equipos portátiles capaces de efectuar una detección rápida de la toxina *in situ* para aplicaciones regulatorias en los programas de calidad. El equipo cuantitativo para la determinación de histamina en alimentos, empleado en el presente trabajo, evidencia una buena correlación y compatibilidad con los resultados obtenidos por el método de ELISA. (Gozzi, Piacente, Cruces, & Díaz, 2011)

La determinación de histamina en pescados por el método de ELISA (Enzymelinked immunosorbent assay) utiliza un lector de microplacas es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático. Se basa en la detección del antígeno (Ag) o anticuerpo (Ac), inmovilizado sobre una fase sólida y mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción. La prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos o anticuerpos marcados con una enzima cuyo producto colorido, puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos, posee especificidad entre reactivo y analito, reproducibilidad de resultados, sencillez, rapidez y permite analizar varias muestras simultáneamente. (Gómez C, 2014)

En la transformación de los alimentos, es importante aplicar las buenas prácticas de higiene y los programas de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC). Tratamientos de inactivación Una vez formada la histamina en los alimentos, no hay ningún tratamiento que la inactive, por lo que es necesario aplicar una serie de medidas a lo largo de la cadena alimentaria para evitar que se genere la histamina:

- Minimizar la aparición de bacterias productoras de histamina mediante unas materias primas con calidad higiénica, y donde sea posible, realizar controles microbianos adicionales.
- En el caso de alimentos fermentados, todos los aspectos de la elaboración (incluyendo ingredientes, fermentación y maduración), distribución y almacenamiento deben ser ajustados y equilibrados en cada alimento para minimizar la formación de histamina.

En el hogar debido a que la mayoría de las intoxicaciones histamínicas están relacionadas con una inadecuada conservación de los alimentos y una falta de higiene en la manipulación de los mismos, es recomendable seguir unas buenas prácticas de higiene y conservación de los alimentos (Elika, 2013):

- Limpieza de las manos antes de manipular cualquier alimento.
- Desinfección de los utensilios, tablas y superficies.
- Mantener la cadena de frío durante el transporte de los alimentos crudos susceptibles de ser contaminados con bacterias productoras de histamina.
- Mantener refrigerados los pescados y alimentos en general hasta su preparación y consumo.

Por tanto, 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.

La hipótesis que se plantea para realizar dicho estudio es: El contenido de Histamina presente en el pescado que se expende en el mercado municipal “El ARENAL” de la ciudad de Cuenca, se encuentra dentro de los límites permitidos por la FDA; por lo que no causa daños a la salud de las personas que lo consumen.

OBJETIVO GENERAL

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.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el nivel de Histamina por el Método de ELISA en las diferentes muestras de pescado obtenidas.
- Verificar el cumplimiento del Reglamento de la FDA, en base a los valores obtenidos.
- Elaborar un manual sobre el manejo higiénico del pescado a fin de capacitar a las personas que expenden dicho alimento en el mercado municipal “EL ARENAL”, colaborando así a la preservación de la salud y la seguridad de los consumidores.

CAPÍTULO I

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 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.

1.2 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.

1.3 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)

1.4 Procedimiento

1.4.1 Extracción de la muestra

- Mezclar 10 g de muestra + 90 ml de agua destilada o desionizada en una botella de plástico.
- Agitar vigorosamente durante 15-20 segundos.
- Dejar reposar durante 5 minutos.
- Agitar por segunda vez durante 15-20 segundos.
- Dejar reposar durante 5 minutos.
- Agitar por última vez durante 15-20 segundos.
- Dejar reposar durante 30 segundos.
- Filtrar el contenido a través de papel de filtro o por una jeringa con filtro y pasarlo a un recipiente nuevo.

1.4.2 Dilución del extracto

- Mezclar 100ul ml del extracto filtrado de la muestra + 10ml del tampón diluyente en un tubo de plástico.
- Agitar suavemente para mezclar.

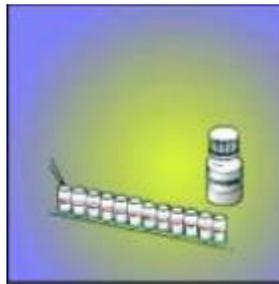


1.4.3 Realización del test

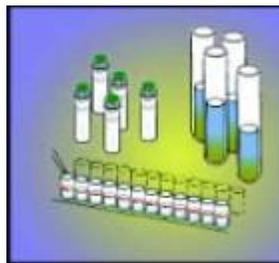
- Antes de empezar el test, comprobar que los reactivos están a temperatura ambiente y agitarlos para asegurar su homogeneidad.



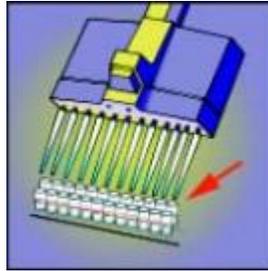
- Coger un pocillo marcado en rojo por cada muestra a analizar más cinco pocillos más para los controles. Coger el mismo número de pocillos cubiertos de anticuerpo.



- Añadir 100ul de conjugado en cada uno de los pocillos marcados en rojo.
- Transferir 100ul de cada control y de las muestras en los pocillos marcados en rojo.



- Con una pipeta multicanal mezclar el líquido de los pocillos marcados en rojo pipeteando arriba y abajo tres veces.
- Transferir 100ul de la mezcla a los pocillos cubiertos de anticuerpo. Descartar los pocillos marcados en rojo.



- Incubar 10 min. a temperatura ambiente.
- Eliminar el líquido de los pocillos.



- Lavar cuidadosamente los pocillos con tampón de lavado 3 veces.

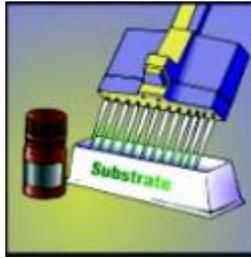


- Picar los pocillos sobre papel absorbente para eliminar los restos de tampón de lavado.

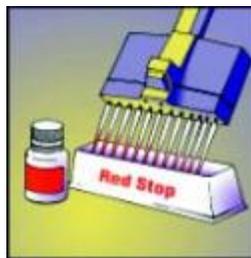


- Poner la solución sustrato en la bandeja de sustrato para facilitar su pipeteado.
- Transferir 100ul de sustrato a los pocillos usando un multicanal.

- Incubar 10 min. a temperatura ambiente.



- Poner la solución de parada en la bandeja de solución de parada para facilitar su pipeteado.



- Transferir 100ul de solución de parada a los pocillos usando un multicanal.
- Leer los resultados entre los primeros 20 minutos. Utilizar un lector de ELISA usando un filtro de 650 nm.



1.4.4 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).



1.4.5 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.

CAPÍTULO II

RESULTADOS

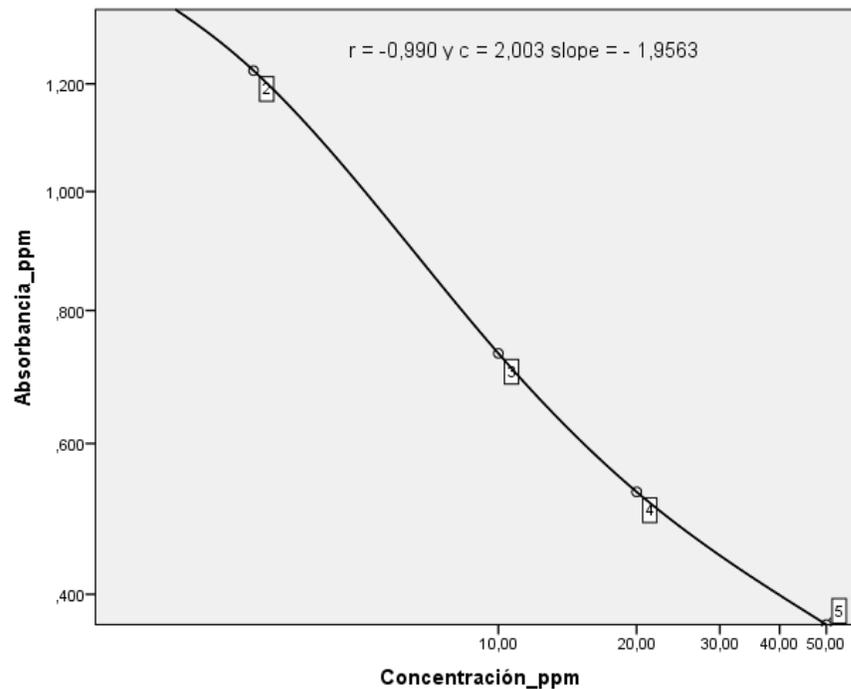
2.1 Resultados para la Curva de Calibración para el Primer Muestreo.

La curva de calibración para este estudio fue construida a partir de concentraciones de 0, 2,5, 10, 20 y 50 ppm de histamina (Tabla 1 y Figura 1).

Tabla 1. Resultados de absorbancia de las concentraciones estándar del Kit Veratox®, lectura a 650 nm en el Primer Muestreo.

Concentración estándar (ppm)	Absorbancia
0	1,548
2,5	1,226
10	0,733
20	0,533
50	0,363

Figura 3. Curva de Calibración del Primer Muestreo



A través del equipo STAT® FAX READER 321, se ha determinado la señal que representa a cada una de las soluciones provistas (controles) por el kit VERATOX con concentraciones conocidas a 650 nm.

Por otro lado es importante establecer que el Kit Veratox® no determina directamente la concentración de histamina; la lectura que realiza es en unidades ópticas que por medio de la curva de regresión pueden ser transformadas a concentración en ppm. Estas unidades ópticas son determinadas a través de la lectura de los controles proporcionados en el kit de reactivos (0, 2,5, 10, 20 y 50 ppm). Esto limita el análisis a determinar concentraciones dentro de este rango únicamente. El Veratox® provee un valor "r" que nos ayuda a determinar qué tanto se ajusta el modelo a la absorbancia. Este valor debe ser superior a 0.98 para que el análisis sea válido. Sin embargo se ha logrado representar gráficamente la curva de calibración necesaria.

Se obtuvo en base a la gráfica tipo spline con ejes a escala logarítmica base 10 una línea de tendencia con cuya regresión lineal se obtuvo un coeficiente de correlación mayor a 0,98; lo que representa una correlación válida, ya que ésta debe ser cercana a 1. Además se puede evidenciar que éste valor contiene un coeficiente negativo (-1), lo que indica que existe una relación perfecta negativa entre las variables estudiadas, es decir mientras aumenta la concentración de Histamina disminuye la señal de Absorbancia y finalmente los valores que pertenecen a la ecuación lineal como la pendiente (slope = -1,9563) y el intercepto u ordenada en el origen que es de 2,003.

2.1.1 Resultado de Cuantificación de Histamina para cada una de las Muestras tomadas en el Primer Muestreo.

Estos resultados corresponden a los análisis de la concentración de histamina de las muestras tomadas en las 7 especies de pescado antes mencionadas, pertenecientes a los 10 puestos de venta de los mismos en el primer muestreo con su respectiva Temperatura que es de 11,5°C.

Tabla 2. Análisis cuantitativo del nivel de Histamina del Primer Muestreo con su respectiva Temperatura.

MUESTREO #1											T (°C)
ESPECIE	P#1	P #2	P #3	P #4	P #5	P#6	P#7	P #8	P #9	P #10	
	Concentración (ppm)										
Bagre	0,8	2,0	3,1	8,0	37,3	8,0	2,6	9,3	4,8	10,1	11,5
Tilapia	9,2	9,4	13,0	7,8	21,3	2,9	5,3	2,1	4,0	2,9	
Albacora	2,5	53,6	101,5	73,6	91,6	236879,0	224,1	88,0	1,1	10006,0	

Tiburón	0,1	1,6	3,8	4,7	1,2	46,2	98,8	4,9	8,5	94,8
Chinito	0,0	0,6	0,6	0,9	0,7	145,6	1,2	27,5	25,4	1,4
Corvina	0,0	1,5	8,5	2,2	23,0	146,9	4,8	0,8	80,5	5,3
Camotillo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

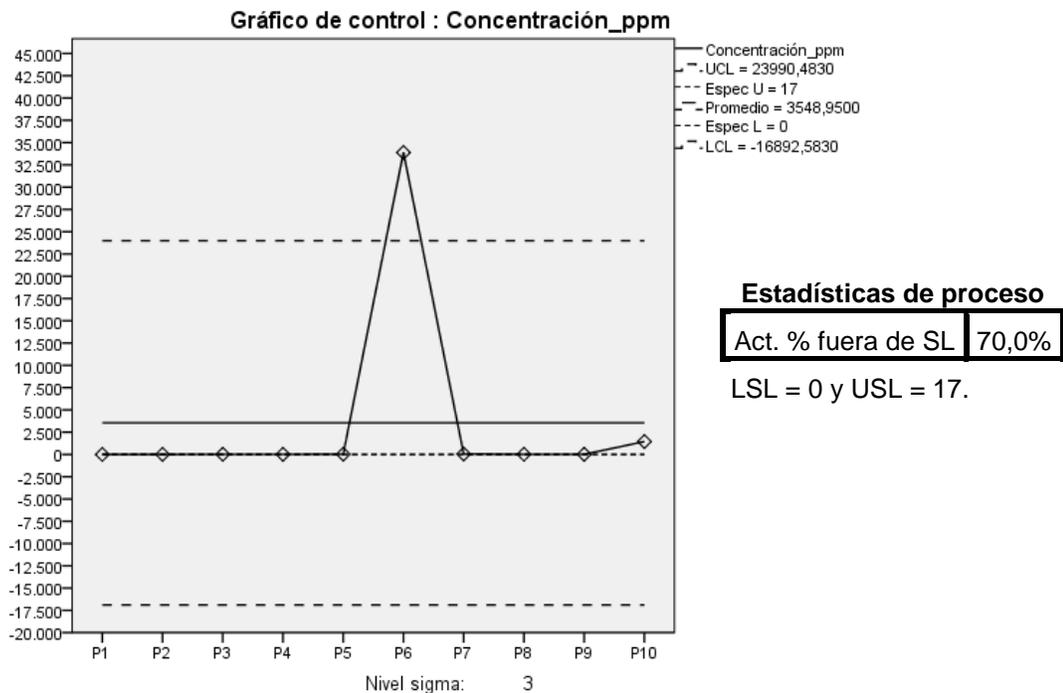
Además, a partir de los resultados obtenidos del primer muestreo, se ha determinado algunos estadísticos; entre ellos algunas medidas de dispersión:

Tabla 3. Estadísticos descriptivos del Primer Muestreo.

	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media		Desviación estándar	Varianza
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Estadístico
Concentración_ppm	70	150,200	,000	150,200	14,2857	3,596	30,0922	905,545
N válido (por lista)	0							

Por otro lado, para determinar los valores de las medias que constituyen la concentración de histamina que pertenecen a los lugares de expendio de pescado en cuestión que se encuentran dentro de los límites de control (0 – 17 ppm), se ha elaborado una gráfica de control de calidad con la determinación conjunta del porcentaje de muestras que se encuentran fuera del límite superior.

Figura 4. Gráfica de Control de Calidad del Primer Muestreo



Como se puede observar, dicha gráfica evidencia a través de la estadística de proceso obtenida junto a la misma que el 70% de los datos se encuentran por encima del límite superior que es de 17 ppm, mientras que por diferencia de la totalidad el 30% se encuentra por debajo del mismo.

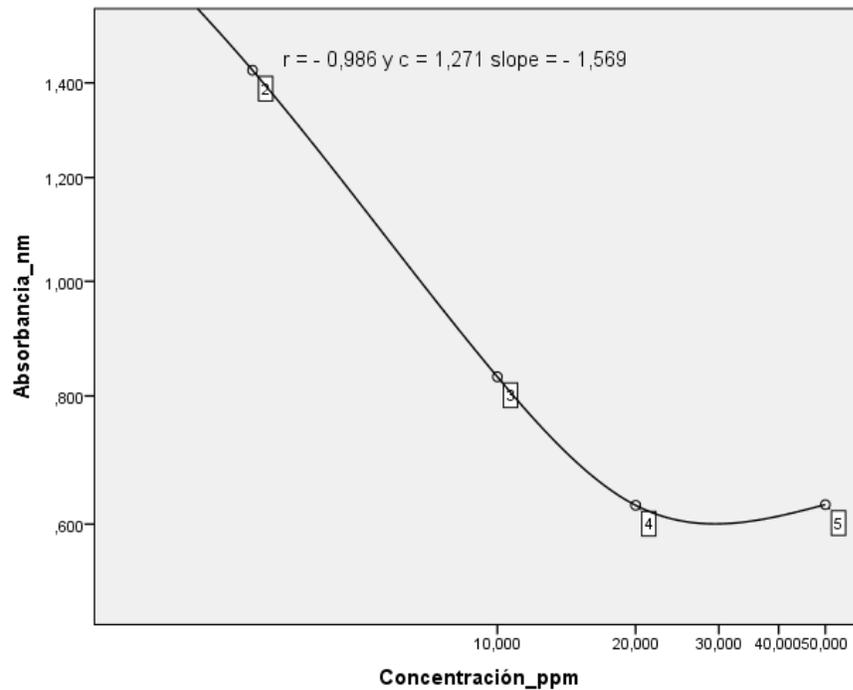
2.2 Resultados para la Curva de Calibración para el Segundo Muestreo.

La curva de calibración para este estudio fue construida a partir de concentraciones de 0, 2,5, 10, 20 y 50 ppm de histamina (Tabla 4 y Figura 4).

Tabla 4. Resultados de absorbancia de las concentraciones estándar del Kit Veratox®, lectura a 650 nm en el Segundo Muestreo.

Concentración estándar (ppm)	Absorbancia
0	2,108
2,5	1,428
10	0,832
20	0,628
50	0,629

Figura 5. Curva de Calibración del Segundo Muestreo



Así mismo, como se había explicado anteriormente se ha obtenido la curva de calibración, en este caso para el segundo muestreo en donde se ha obtenido un $r = -0,986$, el cual indica la linealidad y la correlación entre la variable dependiente e independiente y al tener un coeficiente (-1); se evidencia que existe una correlación perfecta negativa entre las mismas. Además se ha determinado una pendiente de $-1,569$ y un intercepto de $1,271$.

2.2.1 Resultado de Cuantificación de Histamina para cada una de las muestras tomadas en el Segundo Muestreo.

Estos resultados corresponden a los análisis de la concentración de histamina de las muestras tomadas para los 10 puestos de venta de pescado y para las 7 especies antes mencionadas en el segundo muestreo con su respectiva Temperatura que es de $10,5^{\circ}\text{C}$.

Tabla 5. Análisis cuantitativo del nivel de Histamina del Segundo Muestreo con su respectiva Temperatura.

MUESTREO #2											T (°C)
ESPECIE	P#1	P #2	P #3	P #4	P #5	P#6	P#7	P #8	P #9	P #10	
	Concentración (ppm)										10,5
Bagre	0,0	1,0	1,0	10,3	23,5	0,5	3,7	1,4	2,8	0,5	
Tilapia	11,7	8,1	15,6	13,3	14,5	2,5	0,7	3,1	0,9	2,6	
Albacora	1,4	1,6	3,1	0,7	1,1	50,8	96,7	4,0	6,1	88,9	
Tiburón	0,0	1,6	1,4	1,5	3,3	45,0	2,5	19,8	20,7	3,4	
Chinito	0,0	0,4	0,4	9,9	1,4	150,2	10,1	1,0	69,5	11,0	
Corvina	0,0	1,2	7,8	2,4	10,0	126,0	10,6	90,7	14,5	11,6	
Camotillo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

Además, a partir de los resultados obtenidos del segundo muestreo, se ha determinado algunos estadísticos; entre ellos algunas medidas de dispersión:

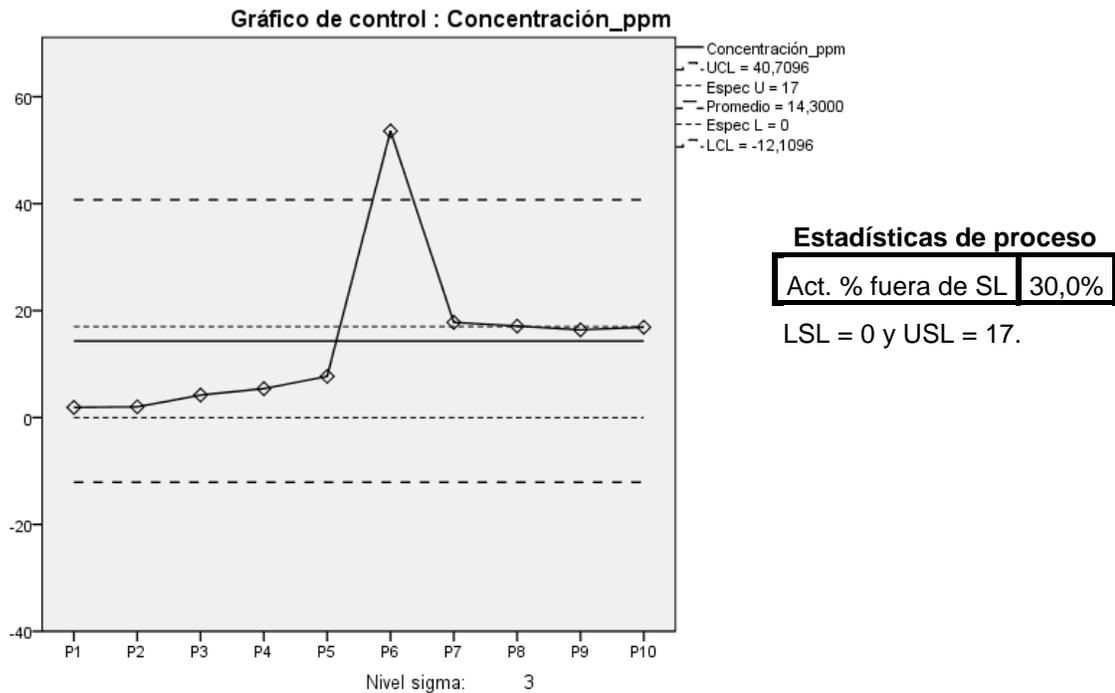
Tabla 6. Estadísticos descriptivos del Segundo Muestreo

	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media		Desviación estándar	Varianza
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Estadístico
Concentración_ppm N válido (por lista)	70 0	150,200	,000	150,200	14,2857	3,5967	30,09227	905,545

Por otro lado, se demuestra que en caso contrario al muestreo anterior; la gráfica de control de calidad determina que el 30% de los datos que constituyen la concentración de histamina en las

especies de pescado analizadas, se encuentran fuera del rango establecido; mientras que el 70% cumple con la limitación reglamentaria.

Figura 6. Gráfica de Control de Calidad del Segundo Muestreo

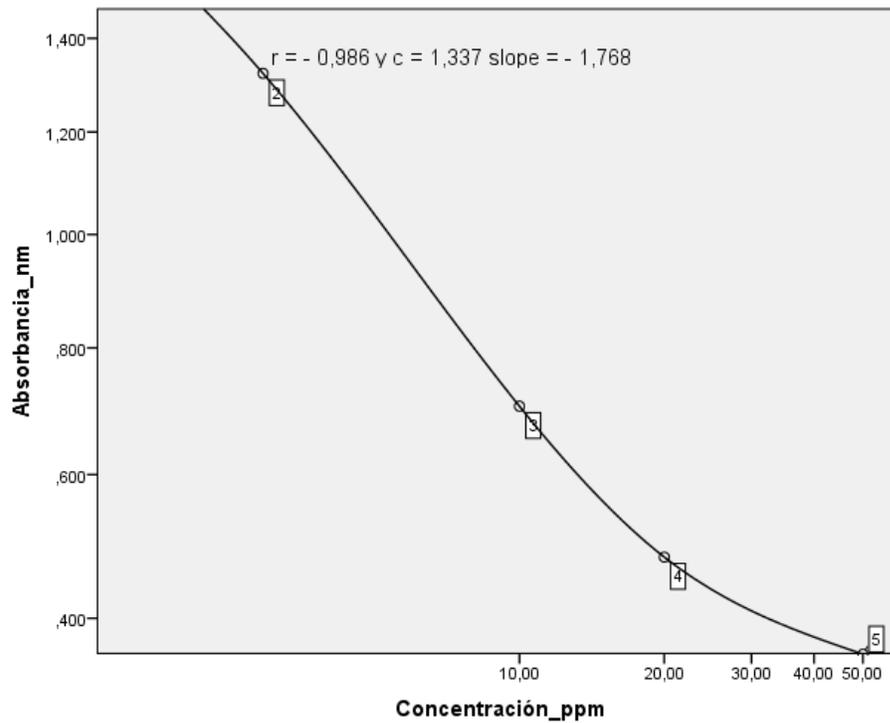


2.3 Resultados para la Curva de Calibración para el Tercer Muestreo.

La curva de calibración para este estudio fue construida a partir de concentraciones de 0, 2,5, 10, 20 y 500 ppm de histamina (Tabla 7 y Figura 7).

Tabla 7. Resultados de absorbancia de las concentraciones estándar del Kit Veratox®, lectura a 650 nm en el Tercer Muestreo.

Concentración estándar (ppm)	Absorbancia
0	1,947
2,5	1,323
10	0,705
20	0,482
50	0,354

Figura 7. Curva de Calibración del Tercer Muestreo

Para elaborar la curva de calibración se realiza el análisis respectivo, el cual se lee en un lector de pocillos para obtener densidades ópticas. Con las densidades ópticas de los controles se traza la curva típica, luego las densidades ópticas de la muestra se grafican contra esa curva, calculando así la concentración exacta de histamina. De la misma forma se obtuvo un r mayor a 0,98, lo que indica una calibración válida y con un coeficiente (-1); que evidencia una correlación perfecta negativa, y así mismo una pendiente de $-1,768$ y un intercepto de $1,337$; los cuales son datos que representan la linealidad de la curva con lo que se determina la concentración de las muestras desconocidas.

2.3.1 Resultado de Cuantificación de Histamina para cada una de las muestras tomadas en el Tercer Muestreo.

Estos resultados corresponden a los análisis de la concentración de histamina de las muestras tomadas para los 10 puestos de venta de pescado y para las 7 especies antes mencionadas en el segundo muestreo con su respectiva Temperatura que es de 10°C .

Tabla 8. Análisis cuantitativo del nivel de Histamina del Tercer Muestreo con su respectiva Temperatura.

MUESTREO #3											T (°C)
ESPECIE	P#1	P #2	P #3	P #4	P #5	P#6	P#7	P #8	P #9	P #10	
	Concentración (ppm)										10,0
Bagre	0,0	1,0	1,3	11,4	22,1	1,9	6,6	5,0	0,7	2,0	
Tilapia	13,5	9,5	18,7	16,2	35,8	12,9	17,3	6,8	2,2	12,8	
Albacora	0,1	1,3	3,0	5,3	2,1	117,0	38,6	8,8	5,9	40,7	
Tiburón	0,0	0,6	1,5	1,7	2,2	75,8	1,4	20,5	15,3	1,6	
Chinito	0,0	1,1	10,3	3,6	19,7	146,1	3,2	0,9	72,9	3,7	
Corvina	3,2	86,0	96,1	86,0	84,7	142,2	16,6	84,8	10,4	16,6	
Camotillo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

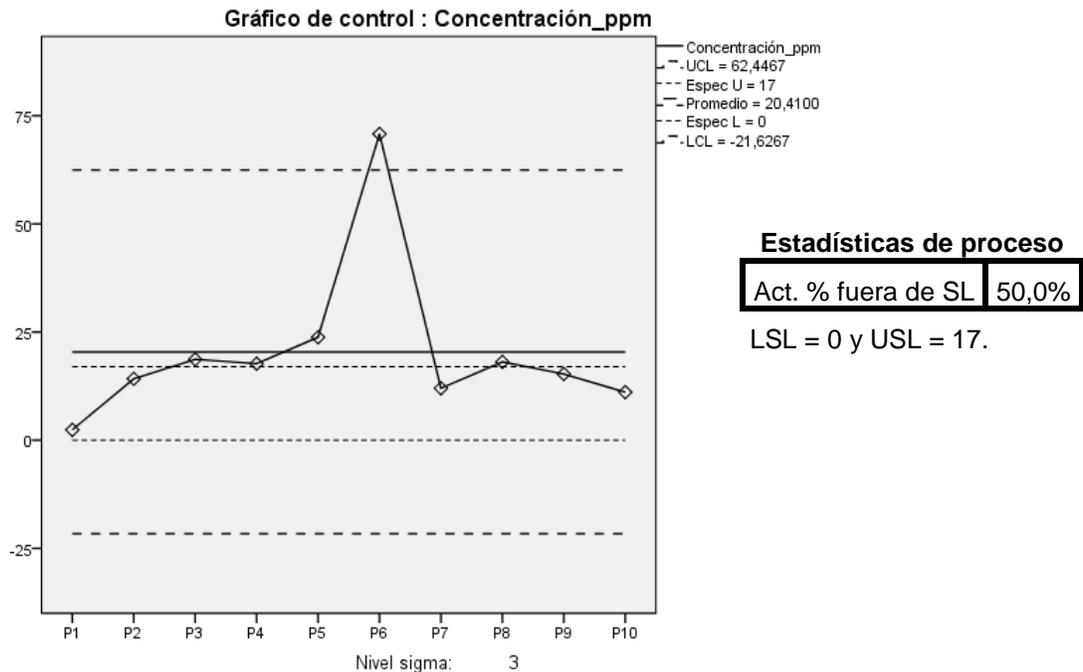
Además, a partir de los resultados obtenidos del tercer muestreo, se ha determinado algunos estadísticos; entre ellos algunas medidas de dispersión:

Tabla 9. Estadísticos descriptivos del Tercer Muestreo

	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media		Desviación estándar	Varianza
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Estadístico
Concentración_ppm	70	146,10	,00	146,10	20,4171	4,1763	34,94210	1220,950
N válido (por lista)	70							

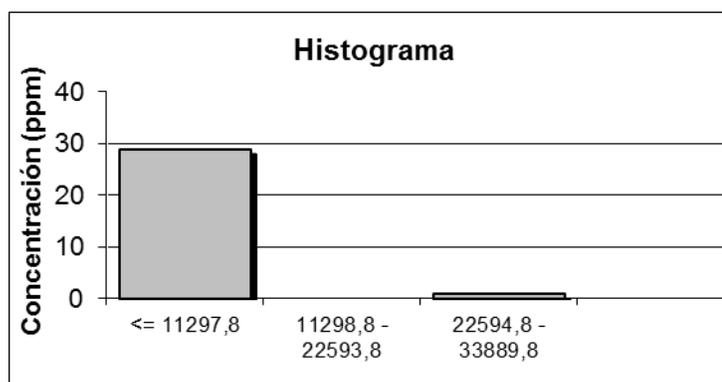
Finalmente, para este muestreo se ha determinado a través de la gráfica correspondiente que la primera mitad de los datos obtenidos se encuentran por debajo del rango establecido por la FDA, mientras que por diferencia el otro 50% no cumple con la regulación señalada.

Figura 8. Gráfico de Control de Calidad del Tercer Muestreo



Con respecto a la totalidad de los valores que constituyen a los tres muestreos, ha sido necesario elaborar un histograma (Figura 7), con el fin de representar las medias de cada uno de estos; con lo cual se puede decir que éste presenta una distribución con una cola larga a la derecha, es decir, muestra un sesgo positivo. Como lo muestra la acumulación de los datos en la parte izquierda de la gráfica y muy baja densidad en la parte derecha, la mayor parte de la concentración de histamina en estudio se ha obtenido en bajos niveles para el número de muestreos realizados. Sin embargo por encima del límite de control mencionado se calcula el 50% de los datos, los cuales seguramente no serán capaces de ocasionar intoxicación histamínica con excepción de las muestras recolectadas del P6 y P10 en los tres muestreos; pero, de acuerdo con lo que se señala en el estudio realizado por Teixeira E. (2010); el cual está basado en la “Evaluación del contenido de Histamina en Atún (*Thunnus sp*) “In natura” y en Sashimi procesado a partir de esta materia prima”, que también no evidenciaron altos contenidos de histamina en las muestras analizadas; que informaciones adicionales deberían hacerse con el objetivo de calificar la presencia de otras aminas biogénicas (putrecina, cadaverina, espermina, espermidina, agmatina, tiramina, triptamina y 2 – feniletilamina) capaces de hacer que el efecto tóxico de la histamina sea potente.

Figura 9. Representación gráfica de la Concentración de Histamina en los Tres Muestreos



Finalmente, 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 10 y 11)

Tabla 10. 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 \pm 3,4	1,9 \pm 4,4	2,4 \pm 5,0	2,0 \pm 0,3
P2	9,8 \pm 19,6	2,0 \pm 2,8	14,2 \pm 31,8	8,7 \pm 6,2
P3	18,6 \pm 36,8	4,2 \pm 5,7	18,7 \pm 34,8	13,8 \pm 8,3
P4	13,9 \pm 26,5	5,4 \pm 5,5	17,7 \pm 30,6	12,3 \pm 6,3
P5	25,0 \pm 32,6	7,7 \pm 8,8	23,8 \pm 29,9	18,8 \pm 9,7
P6	33889,8 \pm 89509,8	53,6 \pm 61,9	70,8 \pm 65,9	11338,1 \pm 19530,4
P7	48,1 \pm 85,5	17,8 \pm 35,1	12,0 \pm 13,7	26,0 \pm 19,4
P8	18,9 \pm 31,9	17,1 \pm 33,1	18,1 \pm 30,2	18,0 \pm 0,9
P9	17,8 \pm 29,0	16,4 \pm 24,6	15,3 \pm 26,0	16,5 \pm 1,3
P10	1445,8 \pm 3774,9	16,9 \pm 32,1	11,1 \pm 14,5	491,3 \pm 826,7

*Promedio y desviación estándar de los 3 muestreos.

Tabla 11. Estadísticos Descriptivos de los 10 Puestos de Venta en los Tres Muestreos

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					P1	3		

P2	3	8,66667	6,178457	3,567134	-6,68147	24,01481	2,000	14,200
P3	3	13,83333	8,342861	4,816753	-6,89148	34,55815	4,200	18,700
P4	3	12,33333	6,297883	3,636085	-3,31148	27,97814	5,400	17,700
P5	3	18,83333	9,660400	5,577435	-5,16443	42,83110	7,700	25,000
P6	3	11338,066	19530,3758	11275,86776	-37178,076	59854,20986	53,600	33889,800
P7	3	25,96667	19,386163	11,192607	-22,19123	74,12457	12,000	48,100
P8	3	18,03333	,901850	,520683	15,79301	20,27365	17,100	18,900
P9	3	16,50000	1,252996	,723418	13,38738	19,61262	15,300	17,800
P10	3	491,26667	826,655202	477,269604	-1562,2587	2544,79203	11,100	1445,800
Total	30	1194,55333	6180,659020	1128,428788	-1113,3426	3502,44934	1,800	33889,800

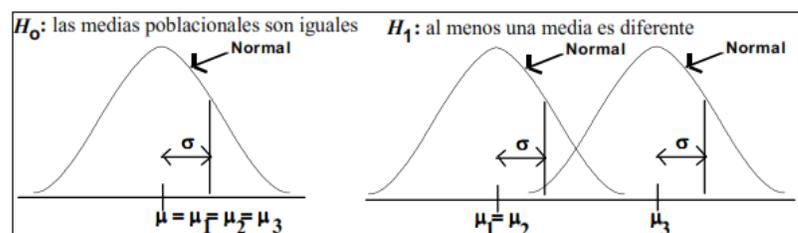
Como es de conocimiento, ANOVA es un nombre genérico y se usa para una variedad inmensa de modelos de comparación de medias, también conocido como diseño de experimentos. Por ahora se explicará ANOVA simple, de un factor, o de una vía (one way ANOVA), que se refiere a la comparación de medias de dos o más tratamientos. Se denomina factor a una variable cualitativa que se usará para designar a los grupos o tratamientos a comparar, que en este caso sería la concentración de Histamina (ppm) y los niveles del factor son el número de tratamientos o grupos, que serían cada uno de los puestos de venta de pescado. Por lo tanto, para realizar dicho análisis es necesario plantear una Hipótesis Global:

Se usará 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

Gráficamente podemos representar esta hipótesis:



Por lo tanto, finalmente se ha establecido el análisis estadístico para poder determinar si existen diferencias significativas entre los promedios entre los niveles de concentración de Histamina según la proveniencia de las muestras (puesto de venta de pescado). A continuación se presenta el cuadro de Estadísticos Descriptivos (Tabla 12) y el cuadro de ANOVA y el estadístico de Fisher calculado (Tabla 13).

Tabla 12. Estadísticos descriptivos. Comparación de Niveles de Histamina por Puesto de Venta de Pescado

	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media		Desviación estándar	Varianza
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Estadístico
Concentración_ppm	10	11336,1	2,00	11338,1	1194,55	1128,0	3567,23	12725159,7
N válido (por lista)	10							

Tabla 13. ANOVA de un factor. Comparación de Niveles de Histamina por Puesto de Venta de Pescado.

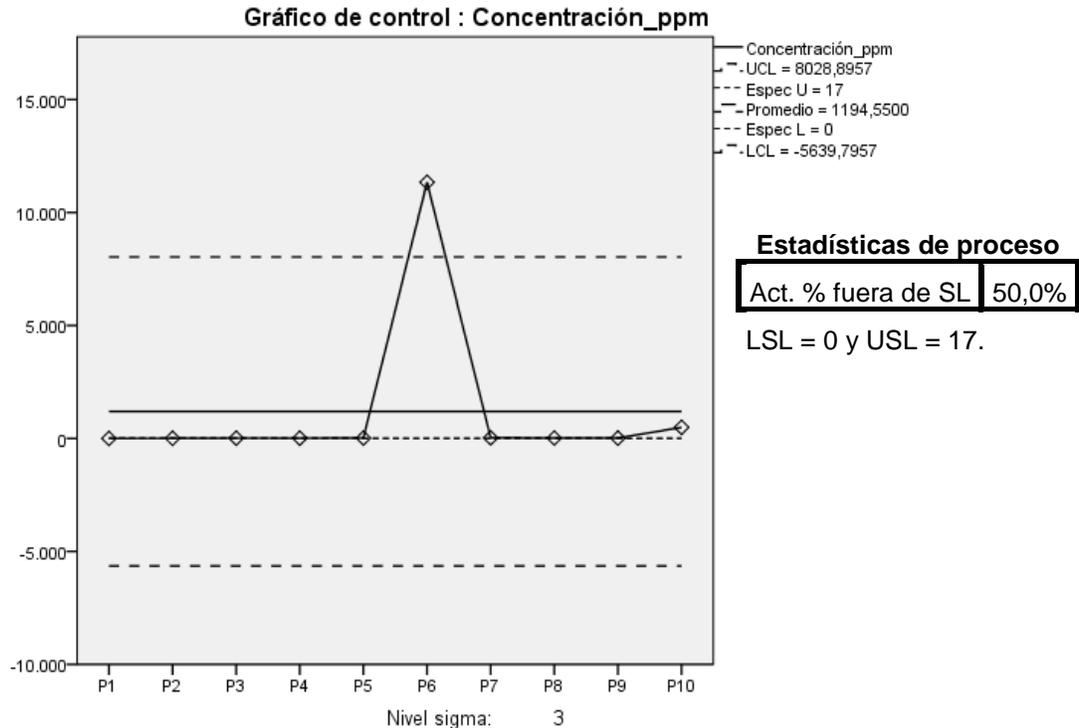
Concentración_ppm

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	343576713,435	9	38175190,382	,999	,472
Dentro de grupos	764239118,220	20	38211955,911		
Total	1107815831,65	29			

El análisis de estos resultados se encuentra en el apartado de Resultados del Capítulo III.

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.

Figura 10. Gráfica de Control de Calidad de los Tres Muestréos



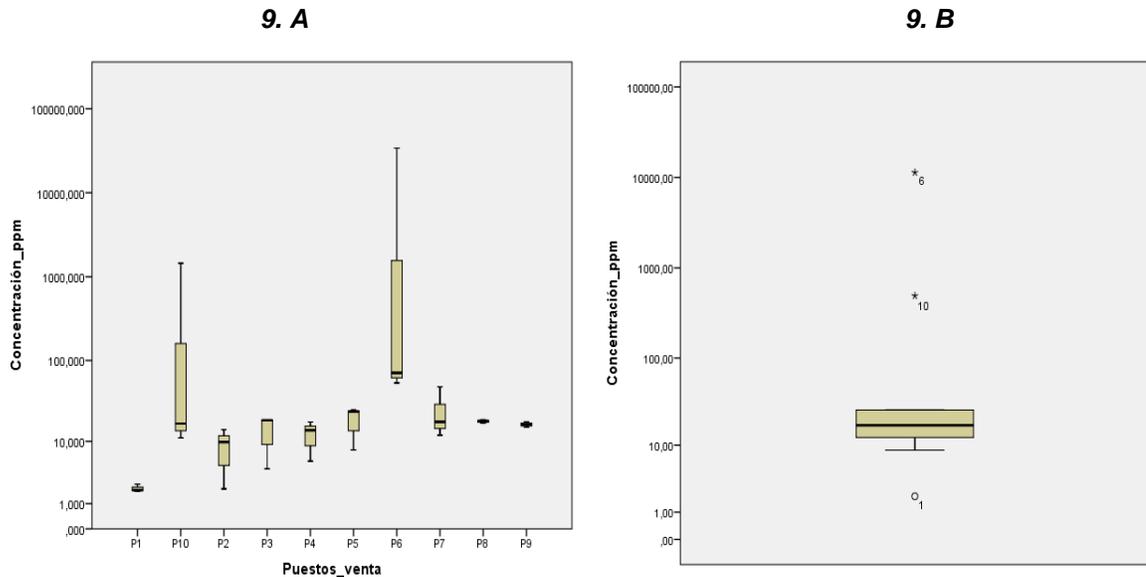
Además, se ha elaborado un diagrama de cajas para demostrar la dispersión y en este caso la asimetría con la que se comportan los datos que constituyen cada uno de los puestos de venta de pescado. En el *gráfico 9.A* se puede observar que en los elementos (P2 al P5) los datos se encuentran concentrados en la parte superior de la mediana (Q2) que es de 17 ppm y (25%); por tanto se trata de una distribución asimétrica negativa o sesgada a la izquierda.

Por otra parte, los Puestos de venta (P1, P8 y P9) muestran una mínima dispersión al tener valores muy cercanos a la mediana, es por esto que no se pueden distinguir los valores mínimo y máximo del rango intercuartílico. Por otro lado el Puesto de venta (P7) al igual que los anteriores mencionados presenta un bajo nivel de dispersión; sin embargo evidencia una mayor concentración de los datos en la parte inferior de la distribución es decir se encuentran por debajo de la mediana (Q2) (25%). Finalmente, como se puede observar los Puestos de venta (P6 y P10) exponen un alto nivel de dispersión de los datos; y al igual que el P7 presentan un sesgo positivo.

En el *gráfico 9.B* se ha representado de manera individual al conjunto de datos, en donde se pueden demostrar de manera global su asimetría negativa o sesgada a la izquierda, a más de la presencia de *outliers*; en donde el círculo representa los valores atípicos, mientras que el

asterisco representa los valores extremos; para lo cual se puede decir que claramente se muestra que el Puesto de venta 6 y 10 son valores atípicos ya que se encuentra por encima del valor máximo, mientras que el Puesto 1 se lo observa con un comportamiento extremo al encontrarse por debajo del valor mínimo del conjunto de datos. En suma se evidencia una vez más que la mitad de los datos cumplen con la regulación de prevención.

Figura 11. Diagrama de Cajas para los Puestos de Venta de Pescado



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 14. 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 representaciones gráficas con respecto a la influencia de la Temperatura (°C) en la Concentración de Histamina (ppm). (Figura 11 y 12)

Figura 12. Gráfica de Barras para la Concentración de Histamina en las Especies de Pescado.

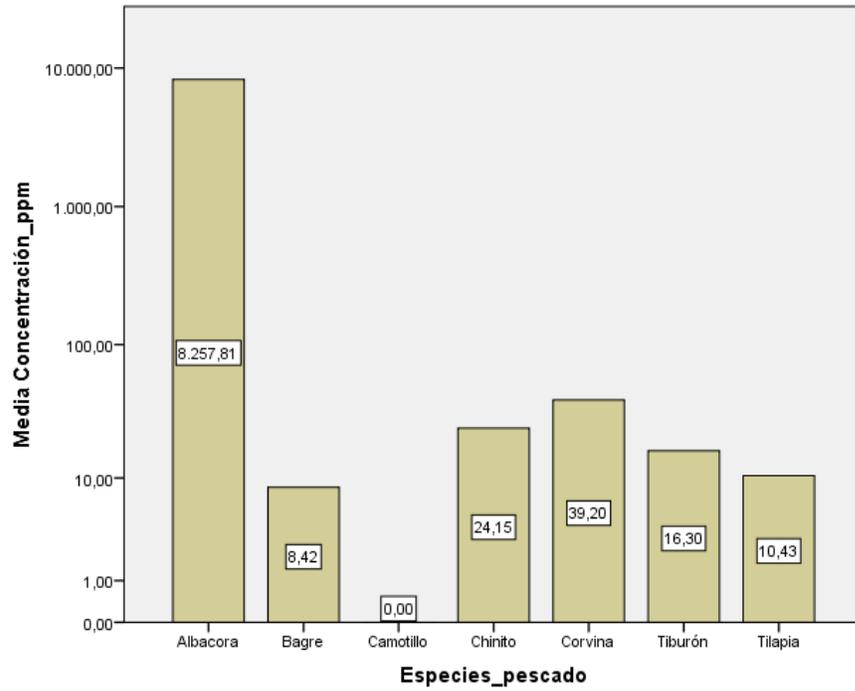


Figura 13. Gráfica de Dispersión para la Concentración de Histamina en Albacora

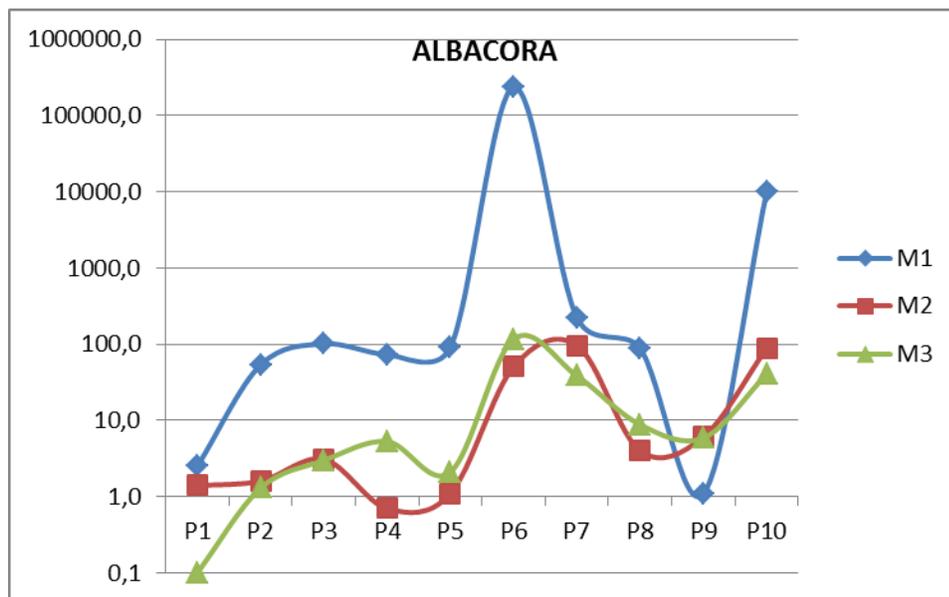
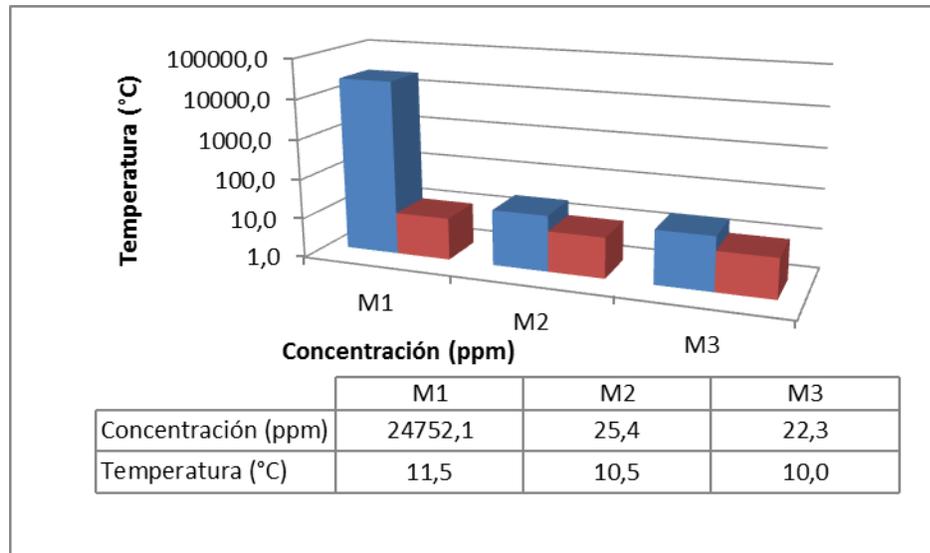


Figura 14. Gráfica de Barras para la Representación de la Temperatura en los Tres Muestras.



El análisis de estos resultados se encuentra en el apartado del Capítulo III de Resultados.

CAPÍTULO III

DISCUSIÓN

Como primera parte, es importante destacar que los niveles de histamina dañinos para el hombre varían, según la comunidad Europea son 100mg/1000gr de histamina en el pescado y según la FDA son 50mg/1000gr como nivel de intervención por razón de riesgos y de 10 a 20 mg/1000g como indicador de manipulación deficiente del pescado. Sin embargo para este estudio se ha establecido como límite de control de 17 ppm, ya que la FDA a través del *Fish & Fishery Products Hazards & Controls Guidance* (2011), determina que cuando las muestras sean compuestas a fin de reducir al mínimo la ocultación de los pescados problemáticos; se deberá contar con 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).

Por otro lado, Field & Calderón (2008) señala que 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. Además Según Bennour et. al (1991) implanta que resulta poco práctico establecer límites reguladores de histamina en productos pesqueros, dado que una vez producida la histamina en el pescado, el riesgo de que se desencadene la escombroidosis o intoxicación histamínica asociada a su consumo es muy elevado, resultando tóxico el pescado aun cuando sea desde el punto de vista organoléptico aceptable al consumidor.

Además se ha analizado cada uno de los muestreos realizados en donde se han representado las siete especies de pescado (bagre, albacora, corvina, tiburón, tilapia, chinito y camotillo) para cada uno de los puestos de venta de los mismos, con el fin de determinar la dispersión de los datos correspondientes a la concentración de histamina con el límite de control antes mencionado. Por consiguiente se ha examinado estadísticamente a los muestreos señalados de manera global, en donde se ha demostrado que se ha trabajado con una distribución asimétrica positiva a más de que se obtuvo el 50% de los valores por debajo de la demarcación regulatoria antes indicada, lo cual se debe a que los lugares de expendio de pescado como el P5, P6, P7, P8 y P10 presentaron concentraciones muy elevadas de histamina en los tres muestreos analizados; ya que estos a pesar de haber observado las mismas condiciones para todos los puestos en los tres muestreos, lo que los diferencia es que las muestras pertenecientes obtuvieron temperaturas elevadas para su adecuada conservación; por lo que se puede decir que contrasta con lo señalado por Fernández (2002), quien a través de su investigación acerca del *“Control de la producción de histamina durante el deterioro del pescado”*; establece que la temperatura interna del pescado deberá llevarse a 10°C o menos, durante las primeras 6 horas

después de capturado el pez. Luego de este enfriamiento inicial, es recomendable llevar el pescado por debajo de los 4°C dentro de las 18 horas siguientes; estas acciones previenen el crecimiento bacteriano y la acción de la histidina descarboxilasa. Así como Izquierdo, P. et al. (2004) señala que la manera como se manipula el pescado determina el crecimiento de bacterias productoras de histamina a partir de la descarboxilación de la histidina. Entre los factores que influyen en la formación de este compuesto, se encuentra la temperatura: se ha recomendado el uso de temperaturas de refrigeración inferiores a 5°C, para inhibir la formación de histamina.

Adicionalmente, como se puede evidenciar en el primer muestreo realizado se ha obtenido el promedio más alto de histamina siendo de 24752,1 ppm; en donde el promedio de temperatura es de 11 °C, lo que difiere con el resto de muestreos; siendo esta de 9 a 9,5 °C respectivamente. Por tanto una vez más se comprueba que la formación de aminas biógenas en el pescado depende de la temperatura, cuya disminución inhibe el crecimiento microbiano y reduce la actividad enzimática. La producción de histamina a partir de histidina libre es frecuentemente inducida por el abuso de temperatura después de la captura del pescado, ya que los niveles alcanzados dependen principalmente de la combinación de los factores de temperatura y tiempo. El elemento más importante para impedir su formación es el rápido enfriamiento del pescado inmediatamente después de la captura y su mantenimiento durante el manejo posterior (Gozzi, Piacente, Cruces, & Díaz, 2011). No obstante, a pesar de tomar en cuenta las precauciones mencionadas después de la pesca; el tiempo es elevado al ser transportado el pescado a la ciudad de Cuenca desde Salinas, Santa Rosa, Puerto Bolívar, Santa Elena y Manta para cada uno de los lugares de expendio en el mercado “El Arenal” que es la localización del estudio, a más de tomar en cuenta el tiempo que demora el producto hasta ser vendido en las condiciones observadas y en este caso a una Temperatura por encima de los 10°C que es la mínima para prevenir la enzima precursora de la escombrotóxina. Con lo expuesto se puede explicar de manera lógica la correlación existente entre la Temperatura y la Concentración de histamina ante este valor tan elevado que presenta este tónico en el primer muestreo.

Por otra parte, se muestra el análisis estadístico basado en ANOVA de un factor con el fin de comparar las medias de las muestras recolectadas, en donde al obtener un nivel de significación intraclassa mayor a 0,05 (0,472), se acepta la hipótesis de igualdad de medias, es decir, no existen diferencias significativas entre los grupos. Para esta parte es importante hacer hincapié que a pesar de que los análisis estadísticos realizados, presenten valores atípicos y extremos; al realizar el test Bonferroni, como test de post – hoc que se ha determinado únicamente para contrastar este indicativo (*Anexo 2*); se puede percatar que efectivamente se

debe aceptar la hipótesis nula. Dichos valores *outliers* se deben originalmente a las malas condiciones de conservación del pescado en los puestos específicos que como se había mencionado anteriormente, presentaron medias muy elevadas; en donde estadísticamente hablando sus medias han sido sensibles a tal efecto.

Finalmente, se puede decir que la especie de pez de Albacora (*Thunnus alalunga*) no solamente incumple con el valor señalado de control, sino que además presenta un valor atípico de nivel de histamina; para lo cual Gozzi, Piacente, Cruces, & Díaz (2011) señala que las especies pertenecientes a la familia *Scombridae*, como en este caso la albacora; contiene un alto contenido del aminoácido histidina, precursora de la histamina, para lo cual sufren este proceso por acción de la enzima histidina descarboxilasa de origen bacteriano. Es importante resaltar que para que se forme histamina tiene que existir histidina libre. Por otro lado, Bulushi Al. et. al (2009) establece que la histamina se produce debido a que los túnidos presentan altos contenidos del histidina libre (más de 100 mg/1000 g de pescado), aminoácido que se degrada por la acción de determinadas bacterias contaminantes de la familia de las *Enterobacteriaceae* (como *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis* o *Serratia marcescens*). La formación de histamina, dependiente de la cantidad de histidina libre que contenga el atún (en este caso atún blanco) y de la contaminación bacteriana inicial, se acelera cuando el pescado se expone a temperaturas ambiente (20 - 25 °C). Por tanto se puede decir que a más de que esta especie ha presentado un alto nivel de histamina por su alto contenido de histidina libre, la influencia de la malas prácticas de manipulación y conservación ha hecho que las *Enterobacteriaceae*, a través de la enzima histidina descarboxilasa se desencadene el nivel de la toxina en estudio.

Además es importante destacar que el estudio realizado por Hernández I. y Suárez S. (2015) del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM) en Cuba acerca del "Contenido de histamina en pescados y productos pesqueros. Efectos de la vigilancia en el período 2010 – 2014"; en donde 128 muestras en todo tipo de presentación y método de conservación fueron analizadas con el objetivo de detectar los niveles de histamina presentes en los pescados y productos pesqueros que pudiesen producir patologías (histaminosis) referentes a las enfermedades producidas por los alimentos (ETA), para lo cual se obtuvo que el 17,24% de las muestras de pescado en el caso del fresco; se encontraron por encima de 100 mg/kg; que es el Límite Máximo de Residuos para esta sustancia en Cuba. Por lo tanto se puede decir que los resultados obtenidos a través de dicho estudio, se aproximan con los niveles de histamina resultantes en las 210 muestras analizadas; de las cuales el 20% se encontraron por encima del LMR establecido por la normativa de dicho país, lo cual evidencia una vez más las falencias en la manipulación del pescado.

Sin embargo, en discrepancia con estos resultados, en otro estudio se observó que después de analizar 35 muestras de pescado; entre éstos el atún que está dentro de la familia *Scombridae* al igual que la albacora, que fueron recolectadas de varias tiendas en Bosnia y Herzegovina por la Inspección Sanitaria del Ministerio de Salud del Cantón Sarajevo; para lo cual así mismo se utilizó un kit comercial para ELISA RIDASCREEN® para Histamina; el 100% de las mismas se encontraron con niveles de histamina por debajo de 100 ppm (Smajlovic A., 2008). Para lo cual se puede señalar que las condiciones en las que trabajan estas tiendas de donde se recolectaron las muestras son apropiadas desde la infraestructura hasta la capacitación del personal.

Además, para hacer hincapié a la influencia de la Temperatura y Atributos Sensoriales en la contaminación del pescado por histamina; cabe indicar que los resultados obtenidos a través del estudio realizado por Gozzi M. et. al (2011), indican que el pescado de la especie caballa (*Familia Socombridae*) mantenidas durante 2 días a la temperatura de 6°C en heladeras domésticas no presentan problemas para la salud humana porque el contenido de histamina se encuentra por debajo del máximo permitido legalmente. No ocurre lo mismo a la temperatura ambiente de 20 °C, en que los ejemplares deben ser desechados después de las 24 horas para su consumo. Por otra parte, sus observaciones advierten que el análisis sensorial no garantiza la inocuidad del producto. Estas observaciones indicarían que los altos niveles alcanzados en algunos casos en ausencia de indicadores sensoriales de deterioro se deben a que después de la muerte los mecanismos de defensa del pescado no inhiben el crecimiento bacteriano y las bacterias productoras de histamina comienzan a crecer y a producirla (FDA, 2001). La proteólisis post-mortem libera histidina adicional a partir de la proteína muscular razón por la cual la concentración de histamina puede alcanzar niveles altos en ausencia de indicadores organolépticos de deterioro (Rossano et al, 2006).

CAPÍTULO IV

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.

Adicionalmente, se recomienda a las autoridades competentes brindar un mayor control y seguimiento en los mercados para poder garantizar de alguna manera la seguridad de consumo para la comunidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

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”.

BENNOUR, M. et. al 1991. M. Chemical and microbiological assessments of Mackerel (*Scomber scombrus*) store in Ice. *J. Food Prot.* 54:789-792. 1991.

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).

Elika. 2013. *Histamina. Elika.* Retrieved 3 July 2016, from http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento100/13.Histamina.pdf.

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>.

FAO. 2011. Manual de Control de Calidad de los Productos de la Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Lima (Perú).

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>.

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>

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].

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.

González, A. (2008). Intoxicación Histamínica o Escombroidosis en Pescado. *16 DE ABRIL*, (219). Retrieved from <http://www.16deabril.sld.cu/rev/219/articulo2.html>

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>.

Hernández Garcarena, 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.

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>.

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

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.

Smajlovic, A. et. al. 2009. "Identification of Histamine Content In Fish Samples". *Scientific and Professional Paper* 10: 3. Web. 24 May 2016.

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.

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].

ANEXOS

Anexo 1: Instructivo del Kit Veratox® para histamina de Neogen®

Producto n.º 9505

*Lea las instrucciones detenidamente
antes de comenzar el análisis*

Veratox®

Análisis Cuantitativo de Histamina



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 escombroides 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 escombroides.

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 peribromados. 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 ensayo de inmunoenzimología de adsorción directa 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

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

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 48 pocillos con revestimiento de anticuerpo
2. 48 pocillos de mezcla marcados en rojo
3. 6 frascos con etiquetas amarillas de controles de histamina con 0, 2.5, 5, 10, 20 y 50 ppm
4. Un frasco con etiqueta azul de solución de conjugado de histamina y peroxidasa de rábano (HRP)
5. 1 bolsa de papel metálico con 10 mM de polvo PBS, el concentrado buffer diluyente del extracto de la muestra
6. 1 frasco de 40 ml de concentrado de buffer para lavado con 10 mM de Tween PBS
7. 1 frasco con etiqueta verde de solución de sustrato K-Blue®
8. 1 frasco con etiqueta roja de solución "Red Stop"

MATERIALES RECOMENDADOS QUE NO SE INCLUYEN

1. 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
2. Probeta graduada de 100 ml
3. Mezclador
4. Soporte para tubos de ensayo (artículo Neogen N° 9443)
5. 16 tubos de ensayo de 100 mm
6. Balanza capaz de pesar 10-50 gramos (artículo Neogen N° 9427)
7. Lector de tiras de pocillos con un filtro de 650 nm (artículo Neogen N° 9302)
8. Pipeta de 12 canales (artículo Neogen N° 9273)
9. Pipeta de 100 µl (artículo Neogen N° 9272)
10. Puntas para pipetas de 100 µl y de 12 canales (artículo Neogen N° 9410)
11. Toallas de papel o de un material absorbente equivalente
12. Soporte de pocillos (artículo Neogen N° 9402)
13. Cronómetro (artículo Neogen N° 9426)
14. Marcador resistente al agua
15. Frasco de lavado (artículo Neogen N° 9400)
16. Frasco de 1 litro con tapa
17. 2 cubetas de reactivo para pipeta de 12 canales (artículo Neogen N° 9435)
18. 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 cobado 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. Quite 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. Cierra 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. Refre 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. Dissuelva 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 al 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, pipeteo 100 µl de sustrato en los pocillos.
10. Mézclelos deslizando 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 reactivos 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 deslizando 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 pueda 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 dilución 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-R/

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, 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, Deoxivalenol (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, Avelana

Modificación genética

- CP4 (Roundup Ready®)

Subproductos para rumiantes

- Harina de carne y huesos, piensos



620 Leisher 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

©Neogen Corporation, 2009. Neogen, Veratox y K-Azid son marcas registradas de Neogen Corporation. Todas las demás marcas y nombres de productos son marcas comerciales o marcas registradas de sus respectivas compañías.

16004D

V-Hist-ENSP_0309

Anexo 2: Comparaciones Múltiples. Estadístico Post – hoc.

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Concentración_ppm							
	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
	Puestos _venta	Puestos _venta				Límite inferior	Límite superior
Bonferroni	1	2	-6,633333	5047,2405	1,00	-19208,252	19194,985
		3	-11,800000	5047,2405	1,00	-19213,418	19189,818
		4	-10,300000	5047,2405	1,00	-19211,918	19191,318
		5	-16,800000	5047,2405	1,00	-19218,418	19184,818
		6	-11336,033	5047,2405	1,00	-30537,652	7865,5855
		7	-23,933333	5047,2405	1,00	-19225,552	19177,685
		8	-16,000000	5047,2405	1,00	-19217,618	19185,618
		9	-14,466667	5047,2405	1,00	-19216,085	19187,152
		10	-489,23333	5047,2405	1,00	-19690,852	18712,385
			2	1	6,633333	5047,2405	1,00
		3	-5,166667	5047,2405	1,00	-19206,785	19196,452
		4	-3,666667	5047,2405	1,00	-19205,285	19197,952
		5	-10,166667	5047,2405	1,00	-19211,785	19191,452
		6	-11329,400	5047,2405	1,00	-30531,018	7872,2189
		7	-17,300000	5047,2405	1,00	-19218,918	19184,318
		8	-9,366667	5047,2405	1,00	-19210,985	19192,252
		9	-7,833333	5047,2405	1,00	-19209,452	19193,785
		10	-482,60000	5047,2405	1,00	-19684,218	18719,018
	3	1	11,800000	5047,2405	1,00	-19189,818	19213,418
		2	5,166667	5047,2405	1,00	-19196,452	19206,785
		4	1,500000	5047,2405	1,00	-19200,118	19203,118
		5	-5,000000	5047,2405	1,00	-19206,618	19196,618
		6	-11324,233	5047,2405	1,00	-30525,852	7877,3855
		7	-12,133333	5047,2405	1,00	-19213,752	19189,485
		8	-4,200000	5047,2405	1,00	-19205,818	19197,418
		9	-2,666667	5047,2405	1,00	-19204,285	19198,952
		10	-477,43333	5047,2405	1,00	-19679,052	18724,185
	4	1	10,300000	5047,2405	1,00	-19191,318	19211,918

	2	3,666667	5047,2405	1,00	-19197,952	19205,285
	3	-1,500000	5047,2405	1,00	-19203,118	19200,118
	5	-6,500000	5047,2405	1,00	-19208,118	19195,118
	6	-11325,733	5047,2405	1,00	-30527,352	7875,8855
	7	-13,633333	5047,2405	1,00	-19215,252	19187,985
	8	-5,700000	5047,2405	1,00	-19207,318	19195,918
	9	-4,166667	5047,2405	1,00	-19205,785	19197,452
	10	-478,93333	5047,2405	1,00	-19680,552	18722,685
5	1	16,800000	5047,2405	1,00	-19184,818	19218,418
	2	10,166667	5047,2405	1,00	-19191,452	19211,785
	3	5,000000	5047,2405	1,00	-19196,618	19206,618
	4	6,500000	5047,2405	1,00	-19195,118	19208,118
	6	-11319,233	5047,2405	1,00	-30520,852	7882,3855
	7	-7,133333	5047,2405	1,00	-19208,752	19194,485
	8	,800000	5047,2405	1,00	-19200,818	19202,418
	9	2,333333	5047,2405	1,00	-19199,285	19203,952
	10	-472,43333	5047,2405	1,00	-19674,052	18729,185
6	1	11336,033	5047,2405	1,00	-7865,5855	30537,652
	2	11329,400	5047,2405	1,00	-7872,2189	30531,018
	3	11324,233	5047,2405	1,00	-7877,3855	30525,852
	4	11325,733	5047,2405	1,00	-7875,8855	30527,352
	5	11319,233	5047,2405	1,00	-7882,3855	30520,852
	7	11312,100	5047,2405	1,00	-7889,5189	30513,718
	8	11320,033	5047,2405	1,00	-7881,5855	30521,652
	9	11321,566	5047,2405	1,00	-7880,0522	30523,185
	10	10846,800	5047,2405	1,00	-8354,8189	30048,418
7	1	23,933333	5047,2405	1,00	-19177,685	19225,552
	2	17,300000	5047,2405	1,00	-19184,318	19218,918
	3	12,133333	5047,2405	1,00	-19189,485	19213,752
	4	13,633333	5047,2405	1,00	-19187,985	19215,252
	5	7,133333	5047,2405	1,00	-19194,485	19208,752
	6	-11312,100	5047,2405	1,00	-30513,718	7889,5189
	8	7,933333	5047,2405	1,00	-19193,685	19209,552
	9	9,466667	5047,2405	1,00	-19192,152	19211,085
	10	-465,30000	5047,2405	1,00	-19666,918	18736,318
8	1	16,000000	5047,2405	1,00	-19185,618	19217,618

	2	9,366667	5047,2405	1,00	-19192,252	19210,985
	3	4,200000	5047,2405	1,00	-19197,418	19205,818
	4	5,700000	5047,2405	1,00	-19195,918	19207,318
	5	-,800000	5047,2405	1,00	-19202,418	19200,818
	6	-11320,033	5047,2405	1,00	-30521,652	7881,5855
	7	-7,933333	5047,2405	1,00	-19209,552	19193,685
	9	1,533333	5047,2405	1,00	-19200,085	19203,152
	10	-473,23333	5047,2405	1,00	-19674,852	18728,385
9	1	14,466667	5047,2405	1,00	-19187,152	19216,085
	2	7,833333	5047,2405	1,00	-19193,785	19209,452
	3	2,666667	5047,2405	1,00	-19198,952	19204,285
	4	4,166667	5047,2405	1,00	-19197,452	19205,785
	5	-2,333333	5047,2405	1,00	-19203,952	19199,285
	6	-11321,566	5047,2405	1,00	-30523,185	7880,0522
	7	-9,466667	5047,2405	1,00	-19211,085	19192,152
	8	-1,533333	5047,2405	1,00	-19203,152	19200,085
	10	-474,76666	5047,2405	1,00	-19676,385	18726,852
10	1	489,23333	5047,2405	1,00	-18712,385	19690,852
	2	482,60000	5047,2405	1,00	-18719,018	19684,218
	3	477,43333	5047,2405	1,00	-18724,185	19679,052
	4	478,93333	5047,2405	1,00	-18722,685	19680,552
	5	472,43333	5047,2405	1,00	-18729,185	19674,052
	6	-10846,800	5047,2405	1,00	-30048,418	8354,8189
	7	465,30000	5047,2405	1,00	-18736,318	19666,918
	8	473,23333	5047,2405	1,00	-18728,385	19674,852
	9	474,76666	5047,2405	1,00	-18726,852	19676,385

Anexo 4:

Manual de Buenas Prácticas de Manipulación y Conservación del Pescado.



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

Manual

Buenas Prácticas de Manipulación y Conservación de pescado

Ing. Gabriela Alexandra Arciniega Alvarado

2016