

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**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**

CÉSAR GUILLERMO FABIAN GÓMEZ

Médico Veterinario

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2014

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**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**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

CÉSAR GUILLERMO FABIAN GÓMEZ

Al conferírsele el título profesional de

Médico Veterinario

En el grado de Licenciado

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2014

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
JUNTA DIRECTIVA**

DECANO: MSc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIA: M.V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo
VOCAL I: Lic. Zoot. Sergio Amílcar Dávila Hidalgo
VOCAL II: MSc. Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III: M.V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV: Br. Javier Augusto Castro Vásquez
VOCAL V: Br. Juan René Cifuentes López

ASESORES

M.V. LUIS ALFONSO MORALES RODRÍGUEZ

M.A. JAIME ROLANDO MÉNDEZ SOSA

MSc. DORA CAROLINA MARROQUÍN MORA

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

**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**

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar al título de:

MÉDICO VETERINARIO

ACTO QUE DEDICO A:

A: Dios por ser el centro de mi vida y permitirme darle esta gran bendición a mi familia.

A MIS PADRES: César Guillermo Fabián Rosales (Q. E. P. D.)
Patricia Lisette Gómez Jáuregui
Por todo el apoyo y amor recibido a lo largo de mi vida.

A MIS ABUELOS: José Víctor Gómez (Q. E. P. D.)
María del Carmen Jáuregui de Gómez (Q. E. P. D.)
Alejandro Fabián Barrientos (Q. E. P. D.)
Berta Rosales de Fabián
Por esa paciencia y comprensión para que esto fuera posible

A MIS PADRINOS: Alirio Arnoldo Fabián Rosales
Rina Angélica Vásquez de Fabián
Por ese cariño y apoyo incondicional que me han dado durante tanto tiempo.

A MIS TIOS: Alejandro Fabián, Marco Antonio Fabián, Enio Rolando Fabián, Berta Fabián de Barillas, Ruth Noemí Fabián de González, Maritza Gómez, Gladys Gómez y Ada Gómez. Por el apoyo que les fue posible en el momento oportuno.

A MI HERMANA: Lucia Patricia Guerra Gómez.

A MIS PRIMOS: En especial a Eduardo Barillas por enseñarme el valor del trabajo y los consejos que me sirvieron para la vida.

AGRADECIMIENTOS

A: Dios todo poderoso por darme la fortaleza, esperanza y sabiduría de hacer esto posible y lograr ser digno de tener esta noble profesión.

A: Dr. Wilson Valdéz, Dr. Luis Morales, Dr. Jaime Méndez y Licda. Carolina Marroquín; por la acertada asesoría y orientación que me brindaron durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A: El personal del laboratorio Agrobiotek especialmente al Lic. Luis Matheu por su colaboración y respaldo en la elaboración de este proyecto.

A: La Clínica Veterinaria San Cristóbal; especialmente a: Dr. Miguel David Rivera y Dr. Juan Carlos Ramón Vidaurre por su orientación y apoyo incondicional brindado en estos años en mi formación académica y la oportunidad de laborar en tan honorable lugar.

A: Mis amigos; Andrea Pérez, Roció Chavarría, Luz Rodas, Nicole Guisbert, Rudy José López, José Roberto Castillo y Javier Akihito Tanimoto Moreno; por formar parte de mi vida y darme la oportunidad de conocerlos y compartir experiencias a lo largo de la carrera.

A: Linda Mellina Gómez Juárez, por el gran apoyo, aprecio y cariño durante estos años y su gran esfuerzo desinteresado en que este

proyecto saliera adelante concluyendo de la mejor manera.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	01
II.	HIPÓTESIS	03
III.	OBJETIVOS	04
	3.1 General.....	04
	3.2 Específico.....	04
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	05
	4.1 El Dorado.....	05
	4.2 La pesca artesanal en Guatemala.....	05
	4.3 Situación de la pesca del Dorado en Guatemala.....	06
	4.4 El manejo post-captura del Dorado.....	07
	4.5 Factores que influyen en la tasa del deterioro del pescado.....	08
	4.6 Tiempo de conservación del pescado en hielo.....	09
	4.7 Formación de histamina.....	10
	4.8 Intoxicación histamínica.....	11
	4.8.1 Manifestaciones clínicas.....	11
	4.8.2 Diagnóstico.....	12
	4.8.3 Prevención.....	12
	4.9 Reglamentación.....	13
	4.10 Métodos de detección de histamina.....	13
	4.10.1 Prueba de ELISA.....	13
	4.10.2 Características técnicas de Veratox Histamina.....	14
	4.10.3 Ventajas del Kit Veratox para Histamina.....	14
	4.10.4 Otros métodos.....	15

V.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
	5.1 Materiales.....	16
	5.1.1 Recursos humanos.....	16
	5.1.2 Recursos de laboratorios.....	16
	5.1.3 Recurso de campo.....	16
	5.1.4 Recursos biológicos.....	17
	5.1.5 Centro de referencia.....	17
	5.2 Metodología.....	17
	5.2.1 Diseño del estudio.....	17
	5.2.2 Procedimiento de campo.....	18
	5.2.3 Metodología del manejo de muestras en el laboratorio.....	18
	5.2.4 Interpretación de Resultados.....	19
	5.2.5 Análisis de Datos.....	19
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
VII.	CONCLUSIONES	27
VIII.	RECOMENDACIONES	28
IX.	RESUMEN	29
	SUMMARY.....	30
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
XI.	ANEXOS	34

ÍNDICES DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados de los muestreos realizados en los mercados El Guarda, Terminal y Sur 2 de la Ciudad de Guatemala.....	21
Cuadro 2. Medidas de Tendencia Central obtenidas de las muestras de los mercados a evaluar.....	22
Cuadro 3. Datos estadísticos de asimetría obtenidos de las muestras de los tres mercados que formaron parte del estudio.....	23
Cuadro 4. Resultados obtenidos en la primera corrida de muestras.....	37
Cuadro 5. Resultados obtenidos en la segunda corrida de muestras.....	38
Cuadro 6. Resultados obtenidos en la tercera corrida de muestras.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de la distribución de datos en los tres mercados por medio de diagramas de cajas (boxplot).....	24
Figura 2. Curva de calibración de las absorbancias obtenidas en la primera corrida de la prueba ELISA Veratox®.....	35
Figura 3. Curva de calibración de las absorbancias obtenidas en la segunda corrida de la prueba ELISA Veratox®.....	35
Figura 4. Curva de calibración de las absorbancias obtenidas en la tercer corrida de la prueba ELISA Veratox®.....	36
Figura 5. Controles del kit Veratox ® para histamina.....	44
Figura 6. Tamaño de la muestra a evaluar (10 gramos).....	44
Figura 7. Muestras a procesar homogenizadas.....	45
Figura 8. Resultados cualitativos de la prueba de histamina con el kit Veratox® en donde la coloración azul indica muy poca o ausencia de histamina y la coloración rosa pálido cantidades elevadas de histamina.....	45
Figura 9. Lector de absorbancias ELx800 del laboratorio Agrobiotek.....	46

I. INTRODUCCIÓN

La carne de pescado se caracteriza por su alta calidad nutricional, ya que contiene pequeñas cantidades de vitaminas, sales y alto contenido de proteínas. El tipo de grasa más abundante es la insaturada, y en los peces pelágicos abundan los ácidos grasos de la serie Omega-3, yodo, fósforo y magnesio. Todas las propiedades anteriormente descritas son aprovechadas por algunas bacterias para formar biotoxinas como en el caso de la histamina.

La histamina se forma en el pescado *post mortem* por descarboxilación bacteriana del aminoácido histidina. Frecuentemente, los pescados afectados son aquellos con un alto contenido natural de histidina, como los pertenecientes a las familias *Scómbridae*, *Clupeidae* y *Coryphaenidae* como el dorado. El dorado (*Coryphaena hippurus*) es un pez marino de la familia corifaénidos distribuido principalmente en el litoral Pacífico de Guatemala. Es capturado para alimentación humana, es muy comercial y de alto valor en el mercado internacional, por lo que muchos pescadores artesanales y flotas de mediana escala se dedican a su pesca para exportación.

Cabe mencionar, que para que el dorado sea aceptado en las exportadoras, tiene que pasar un control de calidad desde el tamaño, golpes y la temperatura, ya que su efecto en la formación de histamina es determinante. Los pescados que no cumplen éstos estándares de calidad, son enviados a los mercados locales a través de cooperativas y su principal mercado es la ciudad Capital

El consumo de carne de pescado con un alto contenido de histamina puede provocar una intoxicación. Los síntomas más comunes en los humanos son los cutáneos, como el rubor facial o bucal, urticaria, edema localizado, pero también puede causar náuseas, vómitos y diarrea; o producirse complicaciones

neurológicas como dolor de cabeza, hormigueo, sensación de quemazón en la boca y en el peor de los casos la muerte por un shock anafiláctico.

Por lo expuesto anteriormente, es de suma importancia determinar los niveles de la biotoxina histamina que contiene la carne de pescado dorado (*Coryphaena hippurus*), El presente estudio contiene los primeros registros obtenidos en siete muestreos realizados en los meses de marzo a mayo del año 2012 de los mercados la Terminal, Sur 2 y el Guarda en la ciudad Capital. Determinando la concentración exacta de histamina por medio de la prueba de laboratorio ELISA específica para histamina.

II. HIPÓTESIS

Los niveles de histamina en la carne del pescado dorado (*Coryphaena hippurus*) objeto de estudio, no son aptos para el consumo humano.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Generar información con respecto a los niveles de histamina en la carne de pescado dorado (*Coryphaena hippurus*) que se expende en tres mercados municipales de la Ciudad de Guatemala.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de histamina en la carne de pescado dorado (*Coryphaena hippurus*) que se expende en tres mercados municipales de la ciudad de Guatemala.
- Determinar los niveles de histamina en la carne de pescado dorado (*Coryphaena hippurus*) en filete fresco que se expende en tres mercados municipales de la ciudad de Guatemala.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 El Dorado

El dorado (*Coryphaena hippurus*) es un pez pelágico perteneciente al orden de los perciformes. Puede llegar a medir 210 centímetros y pesar 40.0 kilogramos en los 5 años que llega a vivir. El dorado se caracteriza por su coloración llamativa, en el dorso se ve un azul o verde intenso y en los flancos un color oro brillante con manchas azules. (12,13)

Otros nombres comunes con que se le conoce al dorado son la llampuga, lampuga, “doirado”, “dolphinfish”, “oldmakrele”, “maihi mahi” y “siira”. (12,13)

El dorado es un pescado con un sabor dulce, sabe menos a pescado comparado con otros peces. Tiene una gran aceptación en países como los EE, UU., Japón y en el Caribe que son los principales demandantes de este producto. (12,13)

4.2 La pesca artesanal en Guatemala

En Guatemala, el recurso pesquero contribuye de manera significativa con los programas de seguridad alimentaria y actividad económica, especialmente en las zonas litorales del país. (5)

Desde hace 40 años la pesca artesanal se ha convertido en una actividad con fines de subsistencia empleando mano de obra no calificada y desempleada que encontró una alternativa laboral diferente del campo. Sin embargo, la pobreza y la falta de igualdad social impiden la consolidación de la actividad pesquera. La necesidad de generar ingresos económicos ha impedido que se manejen los

recursos de manera sostenible, lo cual ha contribuido en la sensible disminución de capturas. (3,5)

Es muy importante resaltar que la pesca solo contribuye al producto interno bruto (PIB) con un 0.03% y aunque este sea un aporte muy pequeño, representa una enorme importancia en la generación de empleo e ingresos económicos en la población ribereña. (5)

4.3 Situación de la pesca del Dorado en Guatemala

El dorado es un recurso pesquero migratorio y es aprovechado principalmente en el Océano Pacífico por pescadores artesanales, que en su mayoría están afiliados a las cooperativas de la Federación Nacional de Pescadores Artesanales FENAPESCA y flotas de mediana escala. Este recurso tiene un comportamiento estacional y temporal que obliga a las flotas pesqueras a realizar largos desplazamientos apoyados en algunos casos por la información satelital de temperaturas superficiales y frentes fríos. (9,12)

La pesca del dorado es un recurso muy joven pero de muy alta demanda a nivel mundial, en Guatemala comenzó a explotarse en el año de 1996 con una embarcación de mediana escala a nivel industrial y se incrementó en el año 2002 a 14 buques registrados. Ante la situación de que el dorado es una especie migratoria y no se reconoce frontera alguna, la Unidad de Manejo de la Pesca y Acuicultura (UNIPESCA), a través de la Organización Latinoamericana de Pesca y Acuicultura (OLDEPESCA), ha realizado un convenio multilateral en la región con el objeto de realizar estudios que permitan en el mediano plazo, administrar responsablemente y de una manera integral dicho recurso. (3, 9, 11,13)

4.4 El manejo post-captura del Dorado

En alta mar, posterior a la captura de dorado, éste es inmediatamente eviscerado y almacenado en hieleras de plástico o fibra de vidrio con suficiente hielo junto a otros productos que se obtuvieron de la pesca. (6,4)

Cuando el pescado es recibido en las playas, se selecciona para fileteado o para venderlo entero y se lava con la finalidad de cerciorarse de eliminar agentes externos que podrían deteriorar su calidad. Al pescado entero ya no se le hace ningún otro proceso, solamente se enhiela para la posterior venta del día. (6)

Las cooperativas de FENAPESCA clasifican el pescado en 4 tipos de calidades existentes en el país: especial, primera, segunda y tercera. El pescado dorado (*Coryphaena hippurus*) se ubica en la categoría “especial” y se vende a las empresas exportadoras o en mercados específicos nacionales porque la paga es muy buena, sin embargo éste tiene que reunir ciertos estándares de calidad, principalmente en el tamaño y la mínima presencia de golpes para que sea aceptado. El pescado que no es aceptado es llevado nuevamente a los centros de acopio para el proceso de fileteado. Los centros de acopio están provistos con insumos mínimos como cofias, mascarillas, gabachas y botas para realizar el proceso, mesas de acero inoxidable, balanzas, tablas plásticas, cuchillos, embandejadoras y agua purificada, la cual es distribuida por medio de mangueras para lavar el producto. Después del fileteado el producto es colocado en bolsas plásticas o en bandejas de duroport, empacadas con film termo encogible para su posterior enhielado (6,4).

Gran parte de los productos de la pesca artesanal son enviados a varios mercados municipales en la capital o en otros centros poblados. El mercado municipal de la ciudad de Guatemala, con mayor movimiento es La Terminal, ubicado en la Zona 4 en donde el intermediario entrega su producto a los distintos

comerciantes que tienen puntos de venta en el área de mariscos. Estos comerciantes colocan el producto en hieleras o cajas sin ninguna limpieza previa y muchas veces sin hielo para transportarlos a su local. (6,2)

Cuando el dorado llega a los locales para su venta, lo exhiben al aire libre, muchas veces con poco hielo o sin hielo, principalmente en filete. Algunos comerciantes colocan un cartel de que tienen ese producto y lo tiene en un congelador hasta venderlos. (2)

4.5 Factores que influyen en la tasa de deterioro del pescado

Los principales factores que influyen en la tasa de deterioro del pescado son la temperatura, los daños físicos y los factores intrínsecos. (8)

La temperatura si es alta aumenta la tasa de deterioro en el pescado, y si el pescado fresco se mantiene a una temperatura baja, su calidad disminuye lentamente. Por lo que cuanto más rápidamente se alcance una temperatura baja durante el enfriamiento del pescado, más eficazmente se inhibirán los procesos de deterioro. Por lo general, la tasa de disminución de la calidad del pescado conservado en hielo (a 0 °C) se utiliza como valor de referencia a efectos de comparación de los tiempos de conservación con diferentes temperaturas de almacenamiento. La relación entre el tiempo de conservación del pescado a 0 °C y a una temperatura t , en °C, se conoce como tasa de deterioro relativa a temperatura en °C. La tasa de deterioro relativa (TDR) se obtiene de la división del tiempo de conservación a 0 °C entre el tiempo de conservación a temperatura en °C. (8)

Los daños físicos se dan por la manipulación brusca y el magullamiento en el pescado, ocasionando la contaminación de su carne con bacterias que permiten la liberación de enzimas, lo que aumenta la tasa de deterioro. Además, una

manipulación poco cuidadosa en pescado no eviscerado puede hacer que revienten las vísceras y que su contenido entre en contacto con la carne del pescado. (8)

Los principales factores intrínsecos que influyen la tasa de deterioro del pescado enfriado son la forma, el tamaño, el contenido de grasa de la carne y el tipo de piel. Por lo general los peces de forma plana tienen una tasa de deterioro baja en comparación con los peces redondos; los peces grandes tienen una tasa baja y los pequeños, una tasa alta. Las especies magras tienen un deterioro bajo y en las especies grasas se eleva considerablemente. (8)

4.6 Tiempo de conservación del pescado en hielo

El enfriamiento del pescado puede ralentizar el proceso de deterioro, pero no lo puede detener. Se trata, por consiguiente, de una carrera contra el tiempo por lo que el pescado deberá ser transportado lo más rápidamente posible. (8)

La principal cuestión que interesa a pescadores, comerciantes y consumidores es cuánto tiempo se conserva el pescado en hielo. Como se ha explicado, el tiempo de conservación dependerá de varios factores; pero el deterioro de todas las especies de pescado sigue un proceso similar, en cuatro fases. (8)

En la fase I se presentan cambios autolíticos, ocasionados principalmente por enzimas. El pez recién pescado está muy fresco y su sabor es dulce, marino y delicado. El deterioro es escaso, con una ligera disminución del aroma y sabor característicos. En algunas especies tropicales este período puede durar dos o más días tras la captura. (8)

En la fase II se produce una reducción significativa del sabor y olor naturales del pescado. La carne adquiere un sabor neutro, pero no desagradable, y la

textura aún es agradable. Esto se debe a los cambios autolíticos ocasionados principalmente por enzimas. (8)

En la fase III el pescado comienza a mostrar signos de deterioro. Hay presencia de sabores desagradables y olores rancios. Se observan cambios significativos de la textura; la carne se vuelve blanda y acuosa, o bien correosa y seca. Esto es ocasionado principalmente por bacterias. (8)

En la fase IV, por los cambios bacteriológicos, el pescado está estropeado y putrefacto, no es apto para el consumo. (8)

4.7 Formación de la histamina

La histamina es una biotoxina que se forma a partir de la descarboxilación de histidina, un aminoácido presente en concentraciones elevadas principalmente en el tejido muscular de los peces de la familia *Scombridae* a la que pertenece el dorado. Este proceso se origina por la acción de determinadas bacterias que se encuentran en el intestino del pescado, aprovechan las concentraciones de histidina para producir la histamina. Las bacterias productoras de histamina son ciertas enterobacterias, vibrios y lactobacilos. Estas bacterias pueden encontrarse en la mayoría de los pescados, probablemente como resultado de una contaminación post captura. Se desarrollan bien a 10 °C, pero a 5 °C el desarrollo se retarda considerablemente. (9)

Debe recalarse 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. (9)

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 al momento de ser ingerido. Presumiblemente, la inhibición del catabolismo intestinal de la histamina causará un mayor transporte de ésta a través de las membranas celulares y en la circulación sanguínea. (9)

4.8 Intoxicación histamínica

La intoxicación por histamina es una intoxicación química debida a la ingestión de alimentos que contienen altos niveles de esta sustancia.

4.8.1 Manifestaciones clínicas

Los síntomas de la intoxicación por histamina son principalmente neurológicos y cutáneos ejerciendo acción sobre el aparato cardiovascular, glándulas endocrinas y músculo liso. Las manifestaciones suelen darse 5 minutos después de la ingesta, o pueden tardar varias horas en manifestarse, todo esto depende de las concentraciones de histamina y otras aminas que se encuentren en el pescado. Los síntomas que pueden manifestarse son:

- Cutáneos: Erupciones, urticaria, inflamación localizada, eritema en cara, cuello y tronco.
- Digestivos: Náuseas, vómito, diarrea, dolor epigástrico, cólicos.
- Circulatorios: Hipotensión o hipertensión, edema, taquicardia, palpitación e inyección conjuntival.
- Neurológicos: Cefalea, hormigueo, calambres, sensación de calor peribucal, pérdida de visión.
- Respiratorios: Bronco constricción, dificultad respiratoria.(9)

Las intoxicaciones pueden ser importantes e incluso fatales si no son tratadas a tiempo. La escombriointoxicación o intoxicación por consumo de pescado con alto nivel de histamina, aparece en el 50 a 100 % de las personas que ingieren pescado, siendo peor para los adultos mayores y aquellos que estén bajo tratamiento con isoniazida. Sin embargo, una ingestión alta de histamina no siempre causa intoxicación, incluso cuando se excede el “nivel de intervención por riesgo” (50 mg/100 g). (9)

4.8.2 Diagnóstico

El diagnóstico se realiza principalmente en forma clínica y se basa en determinar la concentración de histamina en muestras del pescado sospechoso. Las concentraciones superiores a los 10 mg/100g de músculo de pescado (equivalente a 100 ppm) son consideradas de alto riesgo. Generalmente es difícil disponer de una muestra del alimento responsable, por lo que puede también determinarse la concentración de histamina en sangre y orina de los pacientes. Es importante saber que el diagnóstico en ocasiones se realiza con el antecedente que el paciente refiere haber sentido un sabor picante en el pescado y haber consumido *Coryphaena hippurus*. (9)

4.8.3 Prevención

La medida preventiva más eficaz es una baja temperatura de preservación y almacenamiento de los productos de la pesca en todo momento. Otros 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. (9)

4.9 Reglamentación

Varios países han adoptado reglamentos que regulan los niveles máximos permitidos de histamina en el pescado. Los reglamentos de la Unión Europea están publicados en la Directiva 91/493/CEE. Estados Unidos de Norte América ha establecido un doble límite: de 50 mg/100g como nivel de intervención por razón de riesgos y de 10 ó 20 mg/100g como indicador de manipulación deficiente del pescado. En Guatemala el reglamento sanitario tiene incorporadas todas las regulaciones de la FDA de los Estados Unidos, así como las normas establecidas por la Comisión Guatemalteca de Normas –COGUANOR-. Cuando no existen normas nacionales como en este caso, tanto el reglamento como los criterios de la Unidad de Normas y Regulaciones, se basan en el Codex Alimentarius (FAO/OMS). (4, 14,15)

4.10 Métodos de detección de histamina:

4.10.1 Prueba de ELISA:

La determinación de histamina en pescados por el método de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando 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. (11,15).

Veratox para histamina es un kit de ELISA que está especialmente diseñado para realizar un análisis cuantitativo de histamina en dorado o mahi-mahi. Este sistema tiene un rango de cuantificación de 2.5 a 50 partes por millón (ppm). La extracción de la histamina para su valoración con el kit Veratox, se realiza por un sencillo procedimiento con agua. (15)

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. (15)

4.10.2 Características técnicas de Veratox Histamina

- Límite de detección: 2ppm
- Límite de cuantificación: 2.5ppm
- Rango de cuantificación: 2.5ppm a 50ppm
- Controles: 0, 0.5, 5, 10, 20, 50 ppm
- Tiempo de análisis: 20 minutos
- Conservación: 2-8 °C
- Presentación: Kit de 48 pocillos (15)

4.10.3 Ventajas del Kit Veratox para Histamina

- Extracción sencilla con agua
- Contiene todos los reactivos que se requieren para evaluar las muestras
- Resultados cuantitativos confiables
- Las muestras se comparan con controles de valor conocido

- Resultados comparables al método publicado por AOAC (más de un 96% de correlación).

4.10.4 Otros métodos:

Algunos de los métodos para el análisis de aminas biógenas incluyen cromatografía líquida de alta presión, cromatografía de gas y espectrofluorimetría.

(15)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Recursos humanos.

- Estudiante investigador
- Profesionales asesores
- Personal de laboratorio
- Expendedores de pescado

4.1.2 Recursos de laboratorio.

- Kit de ELISA Veratox® (ver anexo C)
- Lector de microplacas para absorbancias ELx800 BoiTek® con un rango de longitud de onda de 340 a 750 nm.
- Refrigeradora

4.1.3 Recursos de campo.

- Hielera
- Hielo
- Bolsas plásticas
- Transporte (vehículo particular)
- Masking tape
- Lápiz y lapicero

4.1.4 Recursos Biológicos.

- Carne de pescado dorado expendida en los tres mercados municipales

4.1.5 Centro de Referencia.

- Laboratorio de la empresa Agrobiotek Laboratorios Guatemala S.A, ubicado en 1 C 2-29 zona 10 ciudad Guatemala.

4.2 Metodología

4.2.1 Diseño del estudio.

Se realizó una investigación del tipo descriptiva, donde se compró una libra de carne de pescado dorado en dos locales escogidos al azar de cada uno de tres mercados municipales de la Ciudad Capital, debido a que era la cantidad mínima de compra.

La Ciudad de Guatemala se encuentra localizada en el área sur-centro del país, está ubicada en el [Valle de la Ermita](#) a unos 1592 (msnm) posee temperaturas muy suaves entre los 12 y 28 °C., Latitud: 14° 37' 15" N, Longitud: 90° 31' 36" O, Extensión: 996km.

Los mercados seleccionados fueron:

- La Terminal 0 Av. Entre 7^a. y 8^a. calle zona 4.
- El Guarda 3^a. Av. Entre 2^a. Y 3^a. Calle zona 11
- Sur 2 6^a. Av. Entre 19^a. Y 21^a. Calle zona 1

En este marco geográfico se consideraron estos tres mercados municipales de la Ciudad de Guatemala debido a que:

- Tienen la mayoría de puestos autorizados por la municipalidad de Guatemala para comercializar sus productos
- Presentan mayor afluencia de personas
- Son distribuidores principales de los mercados satélites.

4.2.2 Procedimiento de campo.

El tamaño de la muestra fue una libra de dorado fresco por local en los tres mercados a evaluar, cada una se introdujo en bolsas plásticas especiales con compartimiento adicional para la identificación correspondiente. Se realizaron siete muestreos, uno por semana (ver tabla 1). En cada muestreo se tomaban 2 muestras por mercado seleccionadas al azar por el expendedor del local. Se procesaron un total de 42 muestras. La muestra se mantuvo con hielo con la cantidad suficiente para la masa del total de pescado.

Las muestras de dorado recolectadas y debidamente identificadas se llevaron al Laboratorio Agrobiotek ® donde se congelaron para retardar de manera considerable el crecimiento de la biotoxina histamina, hasta el momento de su evaluación. (5)

4.2.3 Metodología del manejo de muestras en el laboratorio

Se realizó una prueba ELISA específica para histamina en pescado por medio del kit VERATOX ® de 48 pocillos, tal como lo indica el instructivo (Ver anexo C). Debido a que por cada grupo de controles, solo se pueden procesar diecinueve muestras, se realizaron tres lecturas, dos de 12 muestras en la primera y tercera lectura y en la segunda lectura se procesaron 18 muestras. (Ver anexo B).

4.2.4 Interpretación de resultados

El lector de microplacas ELx800 BoiTek® determinó con las absorbancias obtenidas de los cinco controles la curva de calibración (Ver Anexo A). A partir de aquí, los valores de las muestras fueron introducidos al programa de Veratox Histamine® para calcular su concentración exacta de histamina.

4.2.5 Análisis de datos

Se utilizó la estadística descriptiva para el análisis de datos atípicos por medio de la mediana y su comparación a través de gráficos de cajas o box plot.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio realizado se basó en la obtención de datos mediante una prueba ELISA (Veratox for Histamine®) para la determinación de los niveles de la biotoxina histamina (ppm), contenida en 42 muestras de carne del pescado comúnmente llamado dorado (*Coryphaena hippurus*) expandido en los mercados Guarda, Terminal y Sur Dos ubicados en la Ciudad de Guatemala. El 100% de las muestras evaluadas, se encontraron debajo del límite máximo recomendado por la FDA (50 ppm). (9)

Las lecturas de absorbancias de los 5 controles usados en la curva de calibración permitieron generar mediante un análisis de concentración una gráfica y un modelo matemático descrito por una ecuación. Esta ecuación se utilizó para estimar las concentraciones de histamina de cada muestra a partir de las lecturas de absorbancias obtenidas durante su análisis, reflejando los siguientes valores en el cuadro 1.

Debido a que los datos obtenidos de la prueba ELISA en los tres mercados se distribuyen en su mayoría al lado izquierdo del rango de cuantificación en todos los mercados y para todos los datos (asimetría positiva), se utilizó la mediana como medida de posición central ya que la media aritmética o promedio, por la misma circunstancia no es representativa para la agrupación de datos. Como se puede observar en el cuadro 2.

Cuadro 1. Resultados de los muestreos realizados en los mercados El Guarda, Terminal y Sur 2 de la Ciudad de Guatemala.

No. de muestra	ppm*	No. de muestra	ppm*	No. De muestra	ppm*	Fecha	T ⁰ C
	1 9.5		1 <2.0		1 7.3	1er. muestreo 30/03/2012	20 ⁰ C
	2 <2.0		2 <2.0		2 11.3		
	3 3.4		3 <2.0		3 <2.0	2do. muestreo 06/04/2012	21 ⁰ C
	4 <2.0		4 <2.0		4 2.4		
Mercado El Guarda	5 3.9	Mercado La Terminal	5 <2.0	Mercado SUR 2	5 <2.0	3er. muestreo 13/04/2012	22 ⁰ C
	6 6.4		6 3.8		6 5.6		
	7 2.4		7 <2.0		7 <2.0	4to. muestreo 20/04/2012	24 ⁰ C
	8 7.2		8 <2.0		8 <2.0		
	9 5.2		9 3.2		9 <2.0	5to. muestreo 27/04/2012	23 ⁰ C
	10 3.3		10 9.5		10 <2.0		
	11 50		11 <2.0		11 12.3	6to muestreo 04/05/2012	23 ⁰ C
	12 <2.0		12 <2.0		12 <2.0		
	13 <2.0		13 <2.0		13 <2.0	7mo muestreo 11/05/2012	22 ⁰ C
	14 2.0		14 2.9		14 2.5		

Fuente: Elaboración propia .En donde *ppm es la concentración de la toxina histamina en partes por millón y T⁰ C es la temperatura ambiente en grados centígrados (°C).

Cuadro 2. Medidas de Tendencia Central obtenidas de las muestras de los mercados a evaluar

	MEDIANA ppm*	MEDIA (PROMEDIO) ppm*
GUARDA	3.3	7.9
TERMINAL	0.8	1.7
SUR	1.6	3.4
TOTAL DE LOS MERCADOS	1.7	3.2

Fuente: Elaboración propia. En donde *ppm es la concentración de la toxina histamina en partes por millón

La mediana indica que para todos los mercados evaluados, existe presencia de la biotoxina histamina en la carne de pescado “mahi mahi” o dorado (*Coryphaena hippurus*) pero en bajas concentraciones y que el 50% de los datos obtenidos están por debajo de 1.75 ppm.

En el siguiente cuadro se presenta un resumen de la distribución asimétrica de los datos obtenidos en los diferentes mercados de análisis, agrupados mediante cuartiles (0.25, 0.5, 0.75). En éstos se pueden observar los datos más atípicos y los atípicos extremos que se encuentran en el lado izquierdo en todos los mercados.

Cuadro 3. Datos estadísticos de asimetría obtenidos de las muestras de los tres mercados que formaron parte del estudio

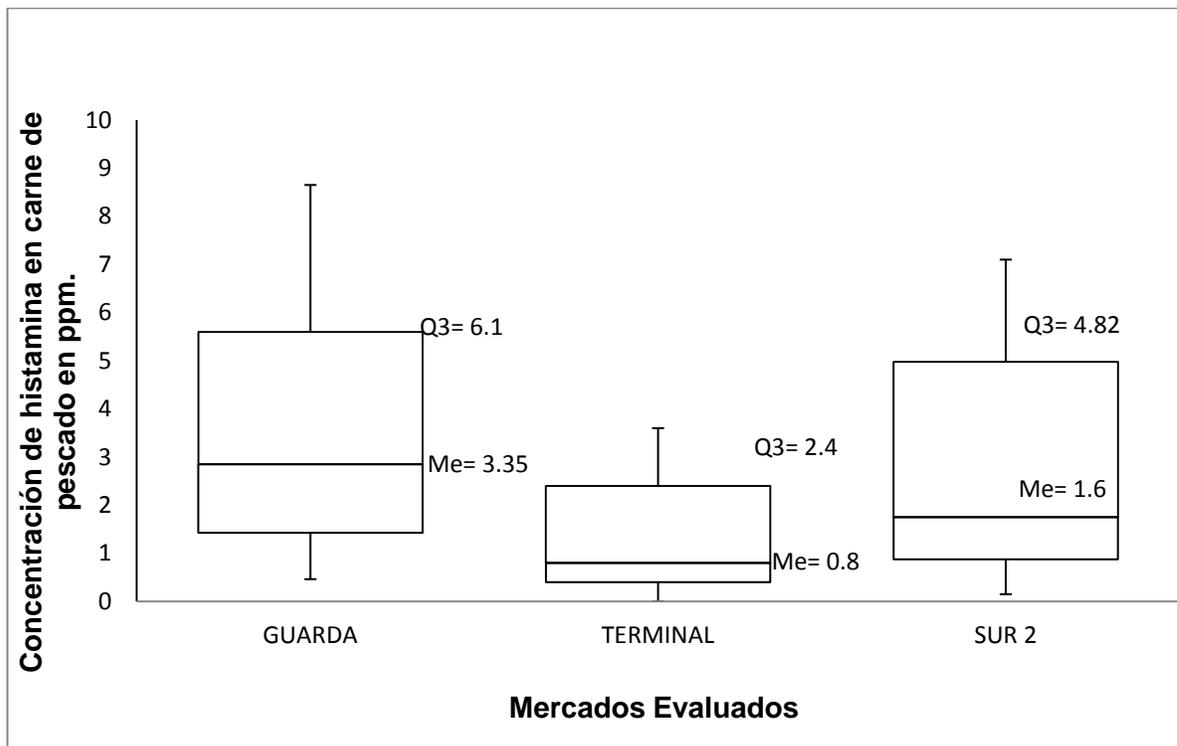
	GUARDA	TERMINAL	SUR

No. DE MUESTRAS	14.0	14.0	14.0
VALOR MÍNIMO (ppm*)	0.0	0.0	0.2
PRIMER CUARTIL (Q1) (ppm*)	1.9	0.3	0.7
MEDIANA (PPM*)	3.3	0.8	1.6
TERCER CUARTIL (Q3) (ppm*)	6.4	2.9	5.6
VALOR MÁXIMO (ppm*)	50.0	9.5	12.3
MEDIA ARITMÉTICA (ppm*)	7.9	1.8	3.5
RANGO (ppm*)	50.0	9.5	12.1
RANGO INTERCUARTÍLICO (ppm*)	4.5	2.6	4.9
DESVIACIÓN MEDIA ABSOLUTA (ppm*)	8.2	1.7	3.2

Fuente: Elaboración propia.* En donde ppm es la concentración de la toxina histamina en partes por millón

Para observar mejor este comportamiento se elaboró el siguiente gráfico boxplot para cada uno de los mercados y así determinar estadísticamente cuál de ellos posee los valores menores.

Figura 1. Comparación de la distribución de datos en los tres mercados por medio de diagramas de cajas (boxplot).



Fuente: *Elaboración propia*

La línea en medio de la caja representa la mediana, Q3 (0.75) es hasta donde se encuentran el 75% de los datos y Q1 el 25%, las líneas o “whiskers” representan los valores atípicos de la muestra. Como se puede observar en el gráfico, la distribución de los datos del mercado La Terminal es mucho más homogénea y su mediana está por debajo del cuartil inferior de los datos obtenidos en los mercados El Guarda y Sur 2, por los que nos indica que los niveles de histamina del mercado La Terminal son menos variables que los del Sur 2 y El Guarda. Teniendo una distribución más homogénea, podemos decir que existe mayor confianza en consumir pescado proveniente de La Terminal que en El Guarda en el que sus datos son más dispersos con rango de 50 ppm.

Siempre hay que recordar que todos estos datos no superan a las 50 ppm que tiene como límite de intervención por riesgo impuesta por Food and Drug Administration (FDA).

Estudios anteriores afirman que el pescado comúnmente llamado dorado (*Coryphaena hippurus*) por ser de la familia de los escómbridos es considerada como una especie altamente susceptible a la formación de histaminas, debido a que se desarrolla rápidamente en la etapa post mortem. La cadena de comercialización de los productos pesqueros provenientes de la pesca artesanal que en su mayoría se venden en los mercados municipales de la Ciudad Capital, (según la Federación Nacional de Pescadores Artesanales FENAPESCA) se integra de la siguiente forma: el pescador artesanal normalmente entrega su producto al comprador en la playa, que regularmente son cooperativas afiliadas a esa institución. Ellos reciben el producto en las lanchas y verifican que en las hieleras de fibra de vidrio o plástico tengan aún suficiente hielo para evitar la descomposición del producto post mortem. (1,6)

El eviscerado del dorado se realiza en las lanchas. Cuando el pescado es recibido se selecciona para fileteado o para venderlo entero y se lava con la finalidad de cerciorarse de eliminar agentes externos que podrían deteriorar su calidad. (6)

Un estudio realizado en Ecuador, indica que el “dorado” (*Coryphaena hippurus*) almacenado a temperaturas ambientales menores de 20 ° C durante un lapso de 24 horas, produce histamina en concentraciones tan bajas que no son perjudiciales para el cuerpo humano. Pero si la temperatura ambiental es mayor a 25 ° C, los niveles de histamina alcanzan cifras peligrosas en cuanto a toxicidad en 12 horas. En este caso las temperaturas ambientales promedio registradas por el INSIVUMEH en los meses de marzo 20.2°C, abril 21°C y mayo 21.7°C no sobrepasaron los 25°C, lo que pudo influir, para que las concentraciones de histamina fueran bajas en la mayoría de las muestras. (1)

En el caso del Mercado La Terminal, la demanda del pescado Dorado es alta porque los vendedores también actúan como intermediarios para abastecer a

mercados menores o a restaurantes que generalmente compran el producto a tempranas horas de la mañana. (2)

Para el mercado el Guarda y Sur 2 los niveles de histamina son más altos, pero siempre es menor del límite de intervención por calidad de la FDA (50 ppm). El punto crítico en la producción de la histamina para estos mercados radica en el tiempo de abastecimiento del producto ya que estos mercados son de menor tamaño y generalmente se abastecen del mercado La Terminal, esto incluye la manipulación del producto de parte del expendedor, el tipo de transporte utilizado y el tiempo en que se tarda hasta llegar al lugar de venta. (2)

VII. CONCLUSIONES

- Se determinó que en todos los mercados muestreados existe presencia de la biotoxina histamina en la carne de pescado “dorado o mahi mahi” (*Coryphaena hippurus*) debido a que la manipulación que recibe cuando lo exhiben para su venta rompe la cadena de frío lo cual favorece el incremento de ésta.
- Los niveles de la biotoxina histamina en la carne del pescado dorado (*Coryphaena hippurus*) obtenidos del mercado La Terminal, Guarda y Sur 2 son inferiores ya que el rango de las muestras están entre respecto a límite de calidad de la FDA 50 ppm.

VIII. RECOMENDACIONES

- El mercado de la Terminal es el mejor lugar para adquirir la carne de pescado Dorado porque los datos obtenidos en la presente investigación nos dan la confianza de que las cantidades de histamina son pequeñas y muy constantes.
- Educar a los consumidores de este tipo de especies pelágicas en donde se les recomiende llevar hielo, hielera y no dejarlo a temperatura ambiente durante mucho tiempo para evitar el incremento de los niveles de histamina.
- Se recomienda proporcionar información sobre la manipulación de especies pelágicas a los expendedores de pescado de los distintos mercados para que sean conscientes de los riesgos que se adquieren con la biotoxina histamina.

IX. RESUMEN

La intoxicación por histamina es una intoxicación química debida a la ingestión de alimentos que contienen altos niveles de histamina. La histamina se forma en el

pescado post mortem por descarboxilación bacteriana del aminoácido histidina. Frecuentemente, los pescados como el Dorado (*Coryphaena hipurus*), el cual es un pez del tipo pelágico perteneciente al orden de los perciformes y cuya carne tiene una alta demanda a nivel internacional, son afectados con un alto contenido de histidina y debido a que la mayoría del pescado que se expende en la ciudad de Guatemala proviene de la pesca artesanal, no se tiene un control de la calidad del pescado.

Se determinó los niveles de histamina en el pescado Dorado (*Coryphaena hipurus*) que se expende en el mercado el Guarda, Sur 2 y la Terminal ubicados en la ciudad de Guatemala por medio de una prueba cuantitativa de ELISA evaluando 42 muestras. Usando la estadística descriptiva los resultados obtenidos indican que en todos los mercados muestreados si existe la presencia de histamina en la carne del pescado Dorado pero con niveles permisibles, debido a que ninguna muestra sobrepaso los límites de calidad establecidos por la FDA (50ppm). Esto puede ser posible debido a que la cadena de frio desde el momento de la captura del pescado al minorista se mantiene a temperaturas adecuadas o que la demanda del Dorado es muy alta en estos mercados ya que no pasa mucho tiempo en venta.

SUMMARY

Histamine poisoning is a chemical intoxication due to the ingestion of foods containing high levels of histamine. Histamine is formed in fish bacterial post mortem by decarboxylation of the amino acid histidine. Often, fish such as Dorado (*Coryphaena hipurus*), which is a fish of the pelagic type belonging to the order Perciformes and the meat is in high demand internationally, are afflicted with a high content of histidine and because the most of the fish sold in the city of Guatemala comes from artisanal fisheries, no one has control of fish quality.

Histamine levels in fish Dorado (*Coryphaena hipurus*) that is sold in the market Guarda, South 2 and Terminal located in the city of Guatemala by a quantitative ELISA was determined by evaluating 42 samples. Using descriptive statistics indicate that the results obtained in all markets sampled if the presence of histamine in the flesh of fish Dorado but permissible levels, because no overshoot shows the quality limits set by the FDA (50ppm). This may be possible because the cold chain from the time of capture fish retailer remains at proper temperatures or Gold demand is very high in these markets as it does not take long for sale.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bostock,T; Barrati, A ; Camba, N.1985. Un estudio de histamina en dorado (MAHI-MAHI *Coryphaena hippurus*) y su relación con la calidad de la pesca ecuatoriana (en línea). INP. Guayaquil, Ecuador. Consultado 23 oct 2013. Disponible en [http://www.oceandocs.net/bitstream/1834/3223/2/ Un% 20 estudio%20de%20histamina%20en%20dorado.pdf](http://www.oceandocs.net/bitstream/1834/3223/2/Un%20estudio%20de%20histamina%20en%20dorado.pdf)
2. [CIMS \(Centro de Inteligencia de Mercados Sostenibles\)/CAMBio \(Mercados Centroamericanos para la Biodiversidad\) 2010.](#) Producto II: manual de oportunidades de mercado viables y factibles para la MIPYME del sector pesquerías sostenibles; fascículo 5 Guatemala (en línea). Costa Rica. Consultado 21 oct 2013. Disponible en [http://www.bcienegociosverdes.com/ Almacenamiento/Biblioteca/270/270.pdf](http://www.bcienegociosverdes.com/Almacenamiento/Biblioteca/270/270.pdf)
3. Convención de las naciones unidas sobre el derecho del mar (1982 España). 1997. Anexo I: Especies altamente migratorias. España. 88p.
4. Escuela Superior politécnica del litoral. 2011. Post captura del dorado. (en línea). Ecuador. Consultado 14 oct. 2011. Disponible en [http:// www.youtube.com/watch?v=yDxxybdqYXs](http://www.youtube.com/watch?v=yDxxybdqYXs)
5. [FAO \(Food and Agriculture Organization, IT\). 2004. Perfiles sobre la pesca y acuicultura por países: Guatemala. \(en línea\). Consultado 15 oct 2011. Disponible en \[www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_GT/es\]\(http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_GT/es\)](#)
6. [FENAPESCA \(Federación Nacional de Pescadores Artesanales, GT\). 2012. Datos de pesca. \(en línea\). Guatemala. Consultado 15 nov 2013. Disponible en <http://www.fenapesca.org/datos-de-pesca.html>](#)
7. Huss.H.H.1995 (a). [El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad: FAO documento técnico de pesca No. 348. Roma. FAO. 195p.](#)

8. Huss.H.H.1997 (b). Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros: FAO documento técnico de pesca No.334. Roma. FAO. 174p.
9. [IARNA \(Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente, GT\). 2009. Perfil ambiental de Guatemala 2008-2009: Las señales ambientales críticas y su relación con el desarrollo. \(en línea\).Guatemala. URL. Consultado 20 oct 2011. Disponible en \[www. Infoiarna. org.gt /media/ file/ PERFAM2008 /PERFAM2008.pdf\]\(http://www.infoiarna.org.gt/media/file/PERFAM2008/PERFAM2008.pdf\)](#)
- 10.INSIVUMEH (Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología, GT). 2012. Registros históricos mensuales. (en línea). Base de datos. Guatemala. Consultado el 05 ene 2014. Disponible en: http://www.insivumeh.gob.gt/meteorologia/ESTACIONES/GUATEMALA/Insivumeh/Temp_Media_Insivumeh.htm
- 11.[INTI-Mar de plata \(Instituto Nacional de Tecnología Industrial, AR\). 2011. Determinación de histamina en pescado para asegurar su calidad. \(en línea\). ABCHOY. Consultado 28 oct 2011. Disponible en \[www. abchoy. com.ar /leernoticias. asp?id=77602&t =Determinaci% F3n+de+ histamina+ en+pescados +para+asegurar+su+calidad\]\(http://www.abchoy.com.ar/leernoticias.asp?id=77602&t=Determinaci%F3n+de+histamina+en+pescados+para+asegurar+su+calidad\)](#)
- 12.[IUCN \(International Union for Conservation of Nature, US\). 2010. *Coryphaena hippurus*. \(en línea\). US. Consultado 4 oct 2011. Disponible en \[www.iucnredlist.org/apps/redlist/154712/0\]\(http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/154712/0\)](#)
- 13.López, Ixquiac. 2002. Análisis de la pesquería de dorado *Coryphaena hippurus* en el litoral del pacífico guatemalteco. UNIPESCA. Guatemala. 93p.

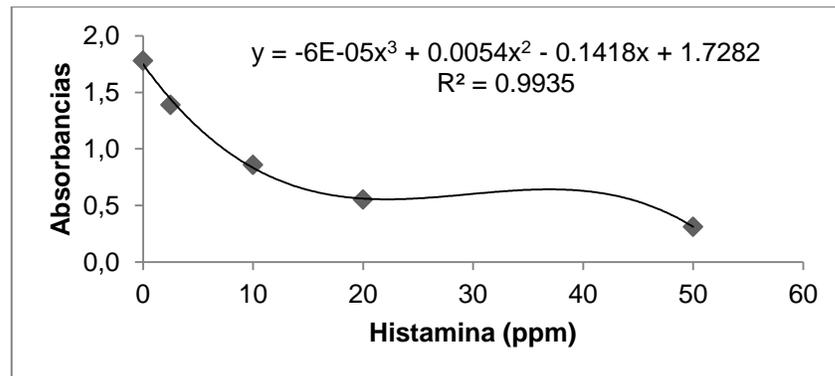
14. Samayoa, Otto. 2006. Guía básica por producto para aprovechar en DR-CAFTA sector hidrobiológico: pescado y productos de pesca. (en línea). Guatemala. Consultado 23 oct 2013. Disponible en : http://www.copades.com/pub/es/doc_interes/economico/guia_tlc/Pescado.pdf

15. Vitaltech Ibérica. 2008. Veratox for histamine: detección y cuantificación rápida de histamina en pescado (en línea). España. Consultado 31 oct 2011. Disponible en http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Veratox_histamina.pdf

XI. ANEXOS

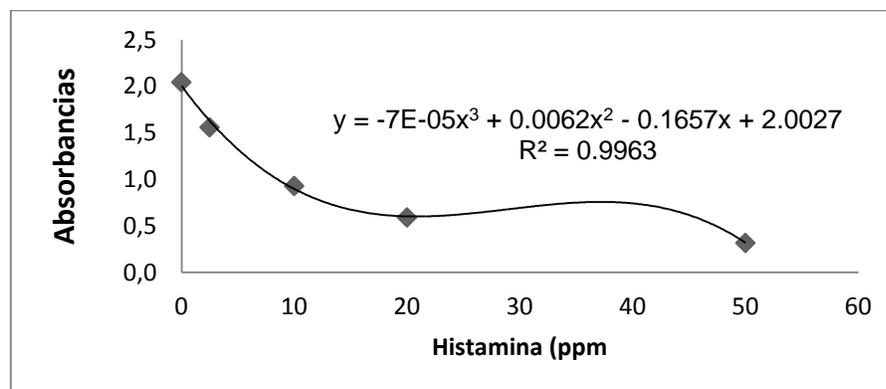
11.1 Curvas de Calibración

Figura 2. Curva de calibración de las absorbancias obtenidas en la primera corrida de la prueba ELISA Veratox®



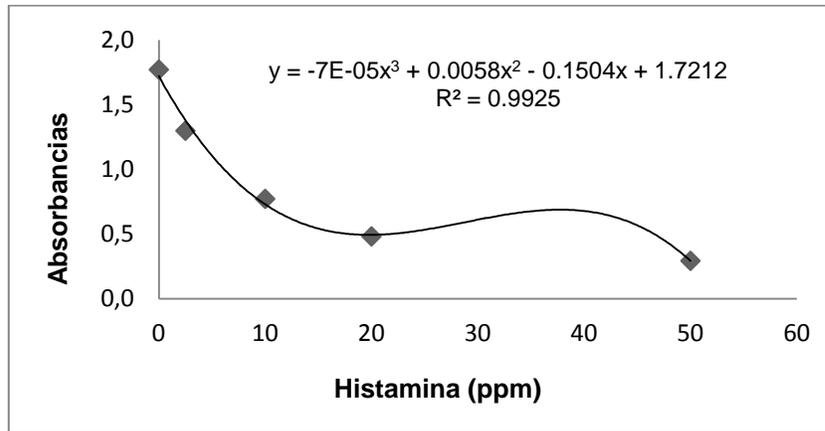
Fuente: Agrobiotek 2012. Curva de calibración de histamina en dorado (*Coryphaena hippurus*) modelo matemático se ajusta en un 99%; en donde “y” es la cantidad de histamina en partes por millón y “x” es la absorbancia obtenida del espectrofotómetro.

Figura 3. Curva de calibración de las absorbancias obtenidas en la segunda corrida de la prueba ELISA Veratox®



Fuente: Agrobiotek 2012. Curva de calibración de histamina en dorado (*Coryphaena hippurus*) modelo matemático se ajusta en un 99%; en donde “x” es la cantidad de histamina en partes por millón y “y” es la absorbancia obtenida del espectrofotómetro.

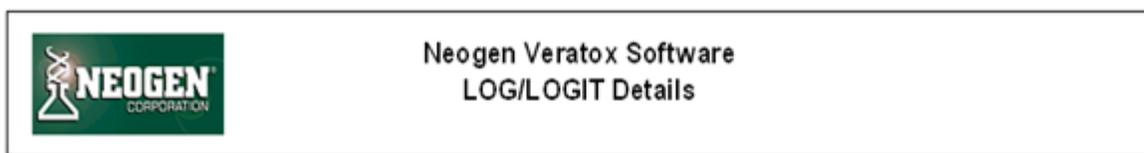
Figura 4. Curva de calibración de las absorbancias obtenidas en la tercer corrida de la prueba ELISA Veratox®



Fuente: Agrobiotek 2012. Curva de calibración de histamina en dorado (*Coryphaena hippurus*) modelo matemático se ajusta en un 99%; en donde “x” es la cantidad de histamina en partes por millón y “y” es la absorbancia obtenida del espectofotómetro.

11.2 Cuadro de Resultados

Cuadro 4. Resultados obtenidos en la primera corrida de muestras.

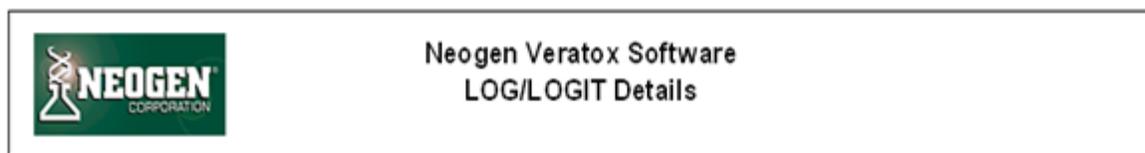


Assay Group: Histamine
Description: Grupo 1
Kit Lot #:

Method: Direct Competitive Method
Slope: -20,302.0000 Corr. Coef.: 9,992.0000 Units: ppm

SAMPLE	DESCRIPTION	OD	RESULT
1	0 ppm	1.780	0,0
2	2.5 ppm	1.390	2,0
3	10 ppm	0.860	9,3
4	20 ppm	0.554	21,2
5	50 ppm	0.313	49,7
6		0.851	9,5
7		1.849	0,0
8		1.577	0,8
9		1.693	0,3
10		0.954	7,3
11		0.784	11,3
12		1.231	3,4
13		1.402	1,9
14		1.720	0,2
15		2.018	0,0
16		1.573	0,9
17		1.341	2,4

Cuadro 5. Resultados obtenidos en la segunda corrida de muestras.



Assay Group: Histamine
Description: Grupo 2
Kit Lot #:

Method: Direct Competitive Method
Slope: -20,574.0000 Cor. Coef.: 9,993.0000 Units: ppm

SAMPLE	DESCRIPTION	OD	RESULT
1	0 ppm	2.044	0,0
2	2.5 ppm	1.560	2,1
3	10 ppm	0.930	9,3
4	20 ppm	0.592	20,8
5	50 ppm	0.318	50,5
6		1.320	3,9
7		1.098	6,4
8		1.813	0,8
9		1.330	3,8
10		1.630	1,6
11		1.158	5,6
12		1.505	2,4
13		1.050	7,2
14		1.782	0,9
15		1.782	0,9
16		1.816	0,7
17		1.846	0,6
18		1.190	5,2
19		1.383	3,3
20		1.403	3,2
21		0.922	9,5
22		1.860	0,6
23		1.803	0,8

Cuadro 6. Resultados obtenidos en la tercera corrida de muestras.

	Neogen Veratox Software LOG/LOGIT Details
---	--

Assay Group: Histamine
 Description: Grupo 3
 Kit Lot #:

Method: Direct Competitive Method
 Slope: -19,087.0000 Cor. Coef.: 9,983.0000 Units: ppm

SAMPLE	DESCRIPTION	OD	RESULT
1	0 ppm	1.772	0,0
2	2.5 ppm	1.299	2,0
3	10 ppm	0.772	9,3
4	20 ppm	0.482	22,3
5	50 ppm	0.293	48,0
6		0.240	63,7
7		1.421	1,3
8		1.509	0,8
9		1.538	0,7
10		0.673	12,3
11		1.689	0,2
12		1.630	0,4
13		1.306	2,0
14		1.704	0,1
15		1.191	2,9
16		1.356	1,6
17		1.232	2,5

11.3 Instructivo del kit Veratox® para histamina de Neogen®

Producto n.º 9505

*Lea las instrucciones detenidamente
antes de comenzar el análisis*



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 escombroide en humanos, que puede dar lugar a una variedad de síntomas, entre ellos, erupción cutánea, náuseas, vómitos, diarrea, hipotensión, palpitaciones y debilidad muscular. También se ha informado casos de parálisis y muerte en casos de intoxicación escombroide.

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

USO PREVISTO

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

USUARIO PREVISTO

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

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO

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

PRINCIPIOS ANALÍTICOS

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

Antes de pocillos para obtener densidades ópticas. Con las densidades ópticas de los controles se traza la curva de calibración. 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 mezclar 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

- 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
1. Probeta graduada de 100 ml
 2. Mezclador
 3. Soporte para tubos de ensayo (artículo Neogen N° 9443)
 4. 16 tubos de ensayo de 100 mm
 5. Balanza capaz de pesar 10-50 gramos (artículo Neogen N° 9427)
 6. Lector de tiras de pocillos con un filtro de 650 nm (artículo Neogen N° 9302)
 7. Pipeta de 12 canales (artículo Neogen N° 9273)
 8. Pipeta de 100 µl (artículo Neogen N° 9272)
 9. Puntas para pipetas de 100 µl y de 12 canales (artículo Neogen N° 9410)
 10. Toallas de papel o de un material absorbente equivalente
 11. Soporte de pocillos (artículo Neogen N° 9402)
 12. Cronómetro (artículo Neogen N° 9426)
 13. Marcador resistente al agua
 14. Frasco de lavado (artículo Neogen N° 9400)
 15. Frasco de 1 litro con tapa
 16. 2 cubetas de reactivo para pipeta de 12 canales (artículo Neogen N° 9435)
 17. Agua destilada o desionizada

PRECAUCIONES

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

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

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

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

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

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

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

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

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

REPETICIÓN DE ANÁLISIS

Si se obtienen resultados positivos en productos que no se habían analizado previamente, confírmelos con un método aprobado adicional antes de tomar medidas. Los resultados entre 2,5 y 40 ppm son cuantitativos. Para asegurar un rendimiento óptimo, los resultados superiores a 40 ppm deben diluirse en partes iguales con el buffer diluyente del extracto, tal y como se describe en la sección "Disolución del extracto de la muestra".

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

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

Límite de la cuantificación: 2,5 ppm (descrito como el punto de concentración más bajo de la curva de calibración en que este análisis puede detectar confiablemente la histamina).

Intervalo de la cuantificación: 2,5 - 40 ppm (para asegurar un rendimiento óptimo, los resultados superiores a 40 ppm requieren una disolución adicional; véase "Disolución del extracto de la muestra" para obtener más instrucciones.)

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

*Matriz validada AOAC-RI

SERVICIO AL CLIENTE

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

INFORMACIÓN DISPONIBLE SOBRE FICHAS DE SEGURIDAD DE LOS MATERIALES

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

GARANTÍA

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

EQUIPOS ANALÍTICOS DISPONIBLES EN NEOGEN

Toxinas naturales

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

Bacterias presentes en los alimentos

- *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*

Saneamiento

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

Alérgenos alimentarios

- Cacahuètes, Leche, Huevos, Almendras, Gluten, Soja, Avellana

Modificación genética

- CP4 (Roundup Ready®)

Subproductos para rumiantes

- Harina de carne y huesos, piensos



620 Leshar 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-Azul 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

11.4 Figuras

Figura 5. Controles del kit Veratox ® para histamina

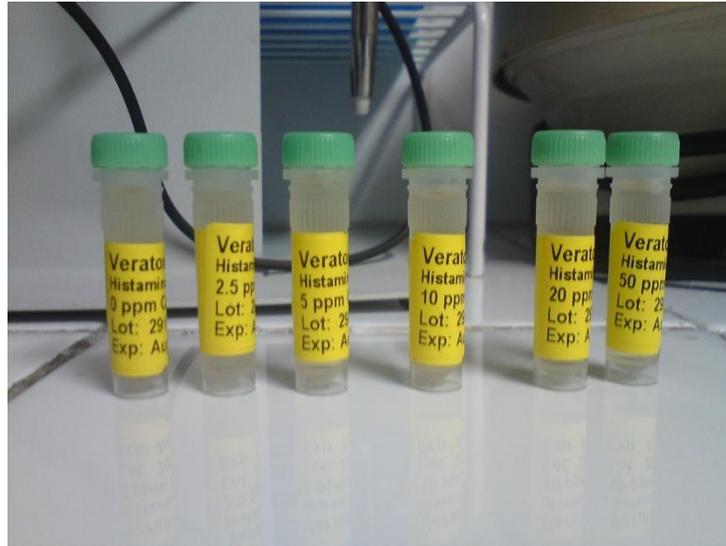


Figura 6. Tamaño de la muestra a evaluar (10 gramos)



Figura 7. Muestras a procesar homogenizadas

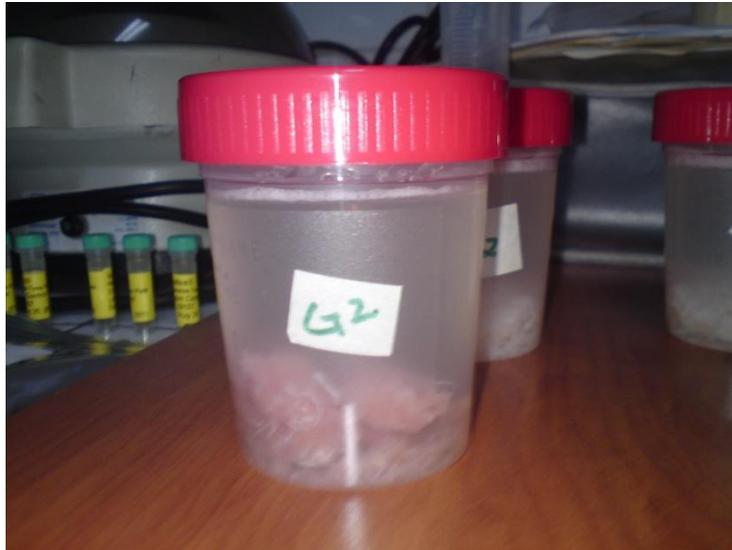


Figura 8. Resultados cualitativos de la prueba de histamina con el kit Veratox® en donde la coloración azul indica muy poca o ausencia de histamina y la coloración rosa pálido cantidades elevadas de histamina.

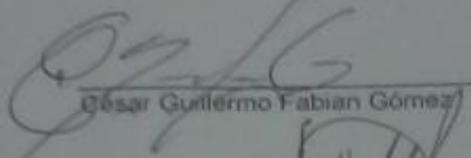


Figura 9. Lector de absorbancias ELx800 del laboratorio Agrobiotek

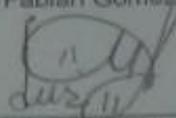


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

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

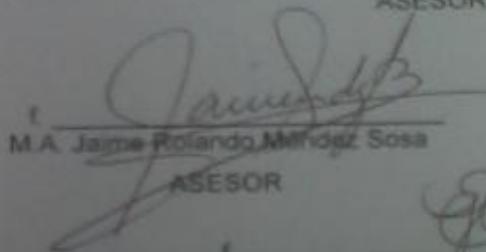


César Guillermo Fabian Gómez



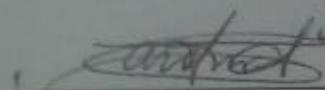
M.V. Luis Alfonso Morales Rodríguez

ASESOR PRINCIPAL



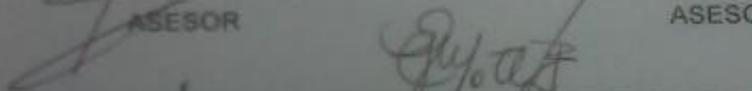
M.A. Jaime Rolando Méndez Sosa

ASESOR



MSc. Dora Carolina Marroquín Mora

ASESORA



MSc. Lucrecia Emperatriz Motta Rodríguez

EVALUADOR

IMPRIMASE



MSc. Carlos Enrique Saavedra Vélez

DECANO

