



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Exposición a histamina por consumo de pescado

Human exposure to histamine from seafood

Autor/es

Daniel Peco García

Director/es

Susana Lorán Ayala
Pilar Conchello Moreno

Facultad de Veterinaria
2020

ÍNDICE:

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	3
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA EMPLEADA	4
4.1 METODOLOGÍA DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:	4
4.1.1 Selección de las fuentes de información.....	4
4.1.2 Selección de los criterios de búsqueda	5
4.1.3 Análisis y clasificación de la información obtenida	6
4.2. METODOLOGÍA DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL:	6
4.2.1 Definición del plan de muestreo	6
4.2.2 Toma de muestras.....	6
4.2.3 Análisis de las muestras	7
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
5.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE DE PELIGRO.....	10
5.2. EVALUACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO DE INTOXICACIÓN HISTAMÍNICA POR CONSUMO DE PESCADO Y PRODUCTOS DERIVADOS	16
5.3. VALORACIÓN DEL RIESGO DE INTOXICACIÓN HISTAMÍNICA EN EL SECTOR DE RESTAURACIÓN COLECTIVA	20
5.4. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE HISTAMINA EN EL SECTOR DE RESTAURACIÓN COLECTIVA Y DE VENTA DIRECTA AL CONSUMIDOR.....	26
6. CONCLUSIÓN	27
7. VALORACIÓN PERSONAL.....	28
8. BIBLIOGRAFÍA	29

1. RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la exposición a histamina en pescado ofertado al público en comercio minorista, tanto para su consumo directo en restauración colectiva como el destinado a la venta en fresco en pescadería.

Para ello se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica acerca de las características del agente de peligro, los factores de riesgo que provocan la intoxicación histamínica, así como su riesgo en restauración colectiva.

Por otro lado se ha realizado también una prospección de campo en la que se han analizado 24 muestras, entre las que se incluyen 22 tapas de distintos establecimientos y con distintos tratamientos culinarios, y también 2 muestras de pescado fresco obtenido en establecimientos de venta directa. De todas las muestras, ninguna presentaba niveles superiores a los permitidos por la legislación vigente en la Unión Europea.

Tras la realización de este trabajo se concluye que hay muchos estudios acerca de la histamina, pero aún no se conoce en su totalidad, ya que a día de hoy no se realizan llevan a cabo unas buenas condiciones higiénicas que eviten su formación, además queda por avanzar en el tema de su control, realizando más controles y desarrollando métodos de control más rápidos, baratos y eficaces. Por otro lado cabe destacar que la exposición a histamina es baja, pero que se siguen observando la aparición de brotes a causa de está, debido a una mala manipulación de la materia prima y por un mantenimiento deficiente de la cadena del frío, por lo que es muy importante la formación del personal en los establecimientos.

ABSTRACT

The main objective of this project is to evaluate the exposure to histamine in fish that is offered to the public in retail, both for direct consumption in collective restoration and that intended for fresh sale in fishmongers.

For this purpose, a bibliographic review has been carried out on the hazard's characteristics and risk factors that cause histamine poisoning. Risk assessment in mass catering has been considered as well.

On the other hand, a field survey has also been realized. For this purpose 24 samples have been analyzed, including 22 tapas from different establishments and culinary treatments, and also 2 samples of fresh fish obtained in direct sales establishments. None of these samples,

had levels above the maximum permitted level set by the legislation in force in the European Union.

According to the results, it is concluded that there are several histamine studies although it is a topic not yet totally known since at the present time there are not good hygienic conditions that prevent its formation. There is also a need to move forward on the issue of its control, carrying out more controls and developing faster, cheaper and more effective control methods. On the other hand, it should be noted that histamine exposure is low, but that outbreaks due to it are still observed because of poor handling of the raw material and poor maintenance of the cold chain, so it is very important to train personnel in the establishments.

2. INTRODUCCIÓN

La histamina es un compuesto que pertenece al grupo de las aminas biógenas, y que está presente de manera natural en el organismo de las personas. Es producida por las células del sistema inmune en las reacciones alérgicas actuando como una sustancia vasodilatadora, por lo que tiene propiedades inflamatorias. También puede sintetizarse y ser liberada por las neuronas del sistema nervioso, actuando como sustancia neuromoduladora (ELIKA, 2019).

Asimismo, la histamina se puede también generar en los alimentos mediante la descarboxilación amínica del aminoácido histidina, la cual es llevada a cabo por distintos tipos de microorganismos que se encuentran en los alimentos (Kovacova-Hanuszkova et al., 2015).

Son diversos los alimentos que pueden contener concentraciones elevadas de histamina, como derivados cárnicos, lácteos y vegetales fermentados, sin embargo, hay que tener en cuenta que los productos de la pesca constituyen el principal grupo de alimentos susceptibles de contener dicha amina, en especial los pescados azules como atún, bonito, sardinas, anchoas, arenque, caballa, etc., debido a su alto contenido en histidina (ELIKA, 2019).

Una vez se ha formado la histamina en un alimento, es muy difícil de eliminar debido a que es una sustancia termorresistente. Es por ello que las medidas preventivas que evitan su formación en los alimentos son muy importantes para garantizar un bajo contenido de histamina, entre ellas la manipulación higiénica de los alimentos y el mantenimiento de la cadena del frío. Además, la formación de histamina puede verse influenciada por la evisceración, produciéndose mayores niveles de histamina en pescados no eviscerados (FAO/WHO, 2013).

El consumo de alimentos con elevadas concentraciones de histamina produce efectos adversos en la salud. La intoxicación histamínica o histaminosis, es conocida como síndrome

escombroides o escombrotismo debido a que la mayoría de casos se producen por consumo de peces de especies pertenecientes a la familia *Scombridae*.

Concretamente se han identificado las especies de peces de las familias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae* y *Scomberesocidae* como peligrosas de producir escombrotismo debido al alto contenido en histidina (FAO/WHO, 2013).

En Europa, el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) reveló que de las notificaciones debidas a concentraciones de histamina elevadas entre 2011 y 2015, un 55,7% eran causadas por atún (Mercogliano y Santonicola, 2019).

Las declaraciones de alertas internacionales, en las que las concentraciones de histamina en productos de la pesca son superiores a los contenidos máximos permitidos, no suelen ser muy frecuentes, pero la aparición de brotes sí que se dan con relativa frecuencia. En Europa se registraron 80 brotes en 2018, asociados principalmente a pescados y derivados, afectando a 488 personas (EFSA, 2019).

Por todo ello es necesario trabajar para garantizar la aplicación de medidas de higiene más efectivas en cada caso, para prevenir la formación de este agente de peligro y controlarlo mediante análisis frecuentes de los productos consumidos.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Hoy en día, la intoxicación más común en Europa por consumo de pescado es la escombroidosis o intoxicación histamínica. La intoxicación histamínica se produce por el consumo de alimentos con elevadas concentraciones de histamina. La distribución de esta intoxicación se da por toda Europa, aunque su incidencia es más elevada en lugares donde el transporte y el almacenamiento del pescado no cumplen las normas higiénicas y sanitarias pertinentes. Sin embargo, en los últimos años se ha registrado en la Unión Europea un incremento de brotes de intoxicación por histamina asociados al consumo de pescado y productos derivados.

El objetivo principal de este trabajo es la recopilación y actualización de la información científica disponible y la evaluación de las medidas para el control de histamina en pescado y productos derivados, especialmente en los sectores de restauración colectiva y de venta directa al consumidor. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar y caracterizar el agente de peligro asociado al riesgo de histaminosis de origen alimentario.

2. Evaluar los factores de riesgo de intoxicación histamínica por consumo de pescado y productos derivados.
3. Valorar el riesgo de intoxicación histamínica en el sector de restauración colectiva.
4. Proponer directrices para el control de histamina en el sector de restauración colectiva y de venta directa al consumidor.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA EMPLEADA

El trabajo que se presenta tiene principalmente un carácter bibliográfico, que se complementa con una prospección de campo, mediante análisis laboratorial de muestras de pescado o derivados obtenidos en bares de la ciudad de Zaragoza.

4.1 METODOLOGÍA DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

La revisión bibliográfica se ha realizado según el método que se describe a continuación:

4.1.1 Selección de las fuentes de información

En primer lugar, se definieron y se seleccionaron las siguientes fuentes de información de carácter nacional:

- Alcorze: es una herramienta de búsqueda unificada proporcionada por la Universidad de Zaragoza, que permite el acceso a los recursos de información (fuentes internas, externas y publicaciones en acceso abierto) de la colección de la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, tanto en formato electrónico como impreso.
- Dialnet: es un portal que recopila y da acceso a documentos publicados en España en cualquier lengua, publicados en español en cualquier país o que traten sobre temas hispánicos, que comenzó en la Universidad de La Rioja.
- Buscador de legislación vigente en página web oficial del BOE (Boletín Oficial del Estado) en España y del BOA (Boletín Oficial de Aragón).
- Para la búsqueda de información sobre el control oficial, se consultó el Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria (PNCOCA), el cual es un documento que describe los sistemas de control oficial a lo largo de toda la cadena alimentaria en España, desde la producción primaria hasta los puntos de venta al consumidor final.
- Se utilizaron como búsqueda adicional, páginas autonómicas que tratan temas de Seguridad Alimentaria, como son la Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria (ELIKA) y la Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (GENCAT).

Por otro lado, se consultaron también fuentes de información de carácter internacional como son:

- ScienceDirect: es una de las mayores plataformas para buscar información sobre investigación científica, técnica y médica. Ofrece los textos completos de revistas científicas publicadas por la editorial Elsevier, así como capítulos de libros, que proceden de más de 2.500 revistas y de más de 11.000 libros. En total, esta fuente de información supera los 9 millones y medio de artículos y capítulos.
- Scopus: es una base de datos de referencias bibliográficas de la empresa Elsevier, que cuenta con herramientas para el seguimiento, análisis y visualización de la investigación. Esta base de datos permite realizar diferentes opciones de búsqueda, el cálculo de citas para facilitar la selección de artículos, y permite también realizar un análisis del rendimiento en investigación de un autor o institución.
- Google Académico (Google Scholar): consiste en un buscador que contiene documentos de carácter académico como artículos, tesis, resúmenes, actas de congresos y patentes.
- Se consultó el portal RASFF (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>), en el que se pueden buscar todas las notificaciones sobre los agentes, en alimentos o piensos, que pueden causar un riesgo para la salud de las personas, a nivel de la Unión Europea.
- Página web de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) y de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

4.1.2 Selección de los criterios de búsqueda

Para facilitar la búsqueda de información de interés se utilizaron las siguientes palabras clave en español/inglés: Histamina/Histamine, Productos de la pesca/Fishing Products”, Pescado/Fish, Seafood, Escombrotismo/Scombrotism, Métodos de análisis/Analysis methods.

Se han utilizado los conectores “AND”, “OR”, “NOT” para poder encontrar artículos válidos para el objetivo general del trabajo.

Para llevar a cabo la selección de la información se utilizaron criterios de inclusión basados en estudios con base científica, publicados en los últimos 15 años, libres de pago y publicados en inglés o español.

A su vez, se han utilizado criterios de exclusión para descartar la información de la revisión bibliográfica, específicamente aquellos que, a pesar de cumplir los criterios de inclusión, aportan información repetitiva, escasa o falta de la misma.

4.1.3 Análisis y clasificación de la información obtenida

Una vez recopilada la información, se procedió a realizar el análisis y clasificación de la misma de acuerdo con los criterios siguientes: identificación y caracterización del peligro histamina, métodos de análisis de histamina en alimentos, estudios epidemiológicos, brotes y alertas causados por dicha amina biógena.

4.2. METODOLOGÍA DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL:

4.2.1 Definición del plan de muestreo

El tipo de muestra que se seleccionó para realizar el experimento, fue el de preparaciones culinarias en el que el alimento principal fuera el pescado, en especial aquellos pescados susceptibles a contener altos niveles de histamina, como son el atún, anchoa, boquerón, arenque y sardina.

La toma de muestras se llevó a cabo en establecimientos de restauración comercial ubicados en la zona de “El Tubo” ya que es la zona de tapas más conocida de la ciudad de Zaragoza.

Los establecimientos de los cuales se tomaron las muestras, según el DECRETO 81/1999, de 8 de junio, del Gobierno de Aragón, por el que se establecen normas sobre ordenación de bares, restaurantes y cafeterías y establecimientos con música, espectáculo y baile, pertenecen al grupo I “Cafés, bares y otros establecimientos”.

4.2.2 Toma de muestras

Las tapas que se incluyeron en el estudio debían contener algún tipo de pescado de los identificados como susceptibles de contener altos niveles de histamina.

En total se recogieron 24 muestras, de las cuales 5 eran de boquerón, 13 de anchoa, 4 de arenque, 1 de bonito y 1 de atún, todas ellas con diferentes preparaciones culinarias, y de 6 establecimientos diferentes.

Tabla 1: Número y tipo de muestras recogidas, así como el tipo de establecimiento en el que se obtuvieron. Fuente: elaboración propia.

Tipo de muestra	Número muestra
Boquerón en aceite	4*
Anchoa en aceite	7*
Boquerón rebozado	1*
Arenque en salmuera	4*
Anchoa en salmuera	4*
Bonito en escabeche	1*
Atún en escabeche	1*
Anchoa fresca	2**

* Adquiridas en bares de tapas

** Adquiridas en supermercados

Todas las muestras, desde el momento de recogida se mantuvieron a temperatura de refrigeración. Tras su recepción, en el laboratorio se sometieron a un tratamiento de congelación a -18°C hasta el momento de su análisis.

4.2.3 Análisis de las muestras

Para el análisis de las muestras se utilizó un kit comercial rápido basado en la técnica de enzimoimmunoensayo competitivo, que es un método que usa complejos de antígeno y anticuerpos para generar un resultado medible, para el análisis cuantitativo de histamina en diferentes tipos de peces escómbridos. El kit rápido es de la empresa BioSystems y contiene lo siguiente:

- Tampón de Lavado Concentrado.
- Sustrato: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB).
- Solución de Paro: Ácido sulfúrico 0,25 mol/L.
- Antisuero Conjugado: IgG anti-histamina conjugadas con peroxidasa.
- Placa de reacción: 48 pocillos.
- Microplaca: 6 tiras de 8 pocillos recubiertos con histamina.
- Tampón Acilante.
- Reactivo Acilante.
- Controles: 8x4 mL de concentraciones 0, 3, 10, 20, 30, 50, 100 y 300 µg/mL (ppm).

Todos los componentes del kit deben mantenerse en refrigeración hasta que se proceda a su uso.

Preparación de las muestras

En primer lugar se descongelaron las muestras en refrigeración, entre 2 y 8 °C, durante 24 horas hasta su análisis. Seguidamente se procedió a la extracción pesando 10 gramos de la muestra, que se añadieron a 240 mL de agua destilada. Se homogeneizó durante 2 minutos con una picadora o batidora.

Una vez pasado ese tiempo, se filtró el homogeneizado (Imagen 1) con un filtro de pliegues o con una Centrífuga Rotofix 32 (Hettich, España), en el caso de las muestras que no se filtraron fácilmente. Después se utilizaron 50 µL del filtrado para la acilación.



Imagen 1: Tratamiento de filtrado de las muestras. Fuente: elaboración propia.

Procedimiento

El kit permite hacer dos tipos de determinación, cualitativa y cuantitativa. Se decidió realizar esta última, ya que aporta valores más precisos. Para ello se tuvo que realizar una recta patrón, con los controles de 0, 3, 10, 30, 100 y 300 ppm, suministrados por el kit.

El proceso experimental consta de 2 fases, una de acilación y su posterior fase ELISA. Todas las muestras y los patrones se analizaron por duplicado.

Es muy importante que todos los componentes del kit se encuentren a Tª ambiente en el momento de su uso.

1) ACILACIÓN:

Para realizar la acilación, se pipetearon 50 µL de los Controles y de la muestra en los respectivos pocillos de la Placa de Reacción. Se añadieron después 1,5 mL del Tampón Acilante, y seguidamente 50 µL del Reactivo Acilante a todos los pocillos. El color viró de amarillo a rosa (Imagen 2).

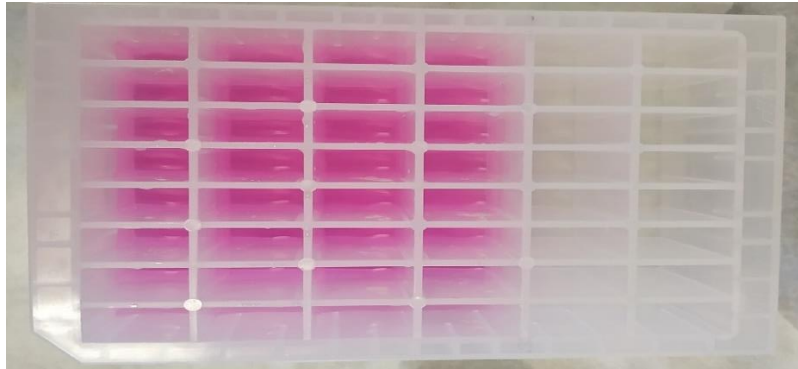


Imagen 2: Proceso de acilación de las muestras. Fuente: elaboración propia.

Se agitó la Placa de Reacción y se dejó reposar 5 minutos a T^a ambiente (20-25°C).

2) ELISA:

Una vez se realizaron los pasos anteriores, comenzó la segunda fase, para ello se procedió a la apertura cuidadosa de la bolsa que contiene la Microplaca, la cual tiene los pocillos recubiertos con histamina. Se retiraron la cantidad de pocillos necesarios y los que no se iban a usar se volvieron a guardar en la bolsa protectora.

Se empezó pipeteando 50 μ L de los Controles y Muestras aciladas en los pocillos de la microplaca. Seguidamente se pipetearon 100 μ L del Antisuero Conjugado en cada pocillo y se agitó durante unos segundos a la vez que se metió la microplaca en la cámara húmeda durante 10 minutos a T^a ambiente (20-25°C).

Una vez pasados los 10 minutos, se desechó el contenido de todos los pocillos y se procedió a su lavado con 300 μ L de Tampón de Lavado, realizando este proceso 3 veces. Cuando se habían lavado los pocillos, se pipetearon 100 μ L del Sustrato en todos los pocillos, y se volvió a incubar la microplaca durante 10 minutos a T^a ambiente.

Tras la segunda incubación se añadieron 100 μ L de Solución de Paro en cada pocillo y se dejó reposar 5 min a T^a ambiente. Por último se procedió a leer las absorbancias en un lector ELISA (marca comercial) a 450 nm. El color es estable durante al menos 10 minutos (Imagen 3).

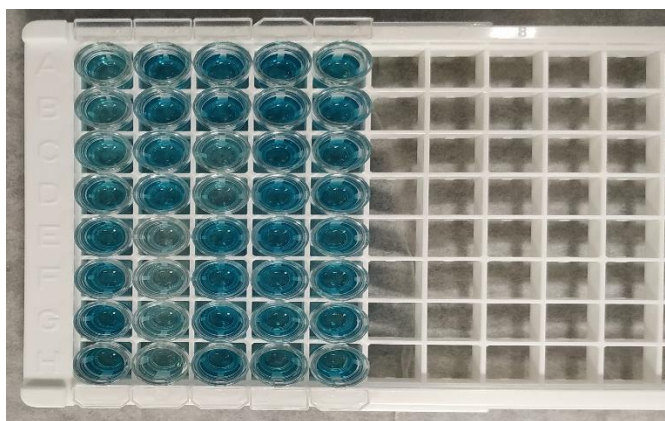


Imagen 3: Color de las muestras finales para analizar en el lector ELISA. Fuente: elaboración propia.

3) CÁLCULOS:

Para representar los datos se dispusieron en el eje X las correspondientes concentraciones de los patrones de histamina en escala logarítmica, y en el eje Y los resultados de las absorbancias de las muestras (media de los duplicados).

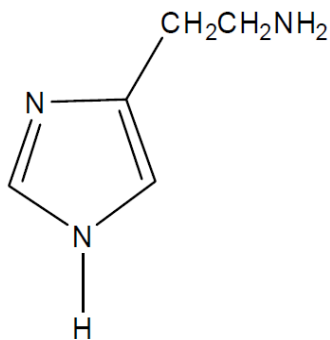
La concentración se calculó interpolando los valores de absorbancia de las muestras, obtenidas en el Lector Elisa, en las ecuaciones de la curva patrón correspondiente, siendo el resultado la media de las dos determinaciones.

La herramienta estadística utilizada para la elaboración de este trabajo, fue la hoja de cálculo Excell, en la que se realizaron las gráficas y la interpolación de las rectas para la obtención de los resultados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE DE PELIGRO

La histamina es una molécula que se incluye dentro del grupo de las aminas biógenas, dicha amina es sintetizada a partir de la histidina, aminoácido esencial que no puede ser sintetizado por los animales y que tiene que ser ingerido a través del consumo de alimentos (ELIKA, 2019). Desde el punto de vista químico, la histamina se formula como 2-[4-imidazol]-etilamina y su fórmula $C_5H_9N_3$. Dicha molécula está compuesta por un anillo imidazólico y un grupo etilamino como cadena lateral (Figura 1). Dentro del grupo de aminas, la histamina es una amina hidrófila y vasoactiva (Rosell, 2015).



Histamine

Figura 1: Estructura química de la histamina. Fuente: EFSA, 2011.

La histamina puede ser sintetizada de manera endógena en el organismo o ser consumida de manera exógena a través de alimentos.

La formación de histamina endógena es catalizada por la enzima histidina descarboxilasa mediante una reacción de descarboxilación, que precisa de vitamina B6 como cofactor.

La histamina se sintetiza y almacena en células especializadas, principalmente mastocitos (células sub-epiteliales de los tejidos), células del endotelio vascular y basófilos de la sangre, que regulan su liberación de acuerdo a la necesidad.

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

El mecanismo de acción de la histamina sobre los tejidos depende de la unión de cuatro tipos de receptores histaminérgicos designados como H1, H2, H3 y H4. Dichos receptores se encuentran presentes en el músculo liso, endotelio y sistema nervioso (H1), células parietales de mucosa gástrica (H2), sistema nervioso central (H3) y en el sistema inmunohematológico (H4) (Pino-Ángeles et al., 2012).

Una vez unida a los receptores, debe ser catabolizada. Este proceso puede llevarse a cabo a través de dos vías, la metilación del anillo por parte de la histamina-N-metiltransferasa (HNMT), que actúa a nivel intracelular, o mediante la desaminación oxidativa por medio de la enzima diamino oxidasa (DAO), que es la vía por la que se metaboliza la histamina a nivel extracelular (Kovacova-Hanuszkova et al., 2015).

Por otro lado, la histamina exógena está ligada al consumo de alimentos con histidina, en los que se ha formado la histamina debido a la presencia de bacterias que contienen la enzima histidina descarboxilasa. Dicha enzima ha sido estudiada, y se han diferenciado dos enzimas

diferentes, el piridoxal fosfato-dependiente y el piruvoyl-dependiente. Las bacterias Gram positivas poseen la enzima histidina descarboxilasa piruvoyl-dependiente, en cambio las Gram negativas poseen la enzima histidina descarboxilasa piridoxal fosfato-dependiente, que es la misma que posee el organismo de los seres humanos para producir histamina endógena (Landete et al., 2008).

El desarrollo de estas bacterias en los alimentos, y por lo tanto la formación de histamina, se ve incrementado por varios factores, como pueden ser: una deficiente calidad de la materia prima, el mantenimiento a temperaturas elevadas durante periodos de tiempo prolongados, higiene deficiente durante la manipulación y procesado o por un inadecuado mantenimiento en refrigeración durante el almacenamiento y distribución (ELIKA, 2019).

Algunos alimentos como pescados y mariscos con altas concentraciones de histidina, así como quesos (especialmente los de maduración prolongada), jamones y otros de tipo de productos fermentados, pueden contener elevados niveles de histamina.

En el caso del pescado, que es objeto de estudio en este trabajo, las bacterias responsables de la formación de histamina son *Escherichia coli*, *Proteus*, especies halófilas de *Vibrio*, *Clostridium* spp., algunas especies de *Klebsiella*, *Salmonella* y *Shigella*. También intervienen bacterias de la microbiota superficial y de órganos como agallas o intestino del pescado, entre ellas *V. harveyi*, *V. fischeri*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* (Carretero et al., 2017).

Es importante destacar la acción simultánea de estas bacterias sobre otros aminoácidos, formando compuestos como cadaverina, espermidina, putrescina y espermina, que están identificadas como sustancias que potencian la toxicidad de la histamina (Carretero et al., 2017).

Una vez se ha formado la histamina en un alimento, es muy difícil de eliminar debido a que es una sustancia termorresistente, por ello las medidas preventivas para evitar su formación en los alimentos son de gran importancia para garantizar bajos niveles de histamina. Las medidas principales de prevención son el correcto mantenimiento de la cadena del frío a lo largo de toda la cadena de producción, y la manipulación higiénica de la materia prima (productos de la pesca) en el procesado de los alimentos. Además, la evisceración del pescado influye en la formación de histamina, produciéndose mayores niveles de histamina en pescados eviscerados, debido a la posible transferencia de las bacterias productoras de histamina, desde el tracto gastrointestinal por una ruptura o derrame del contenido gástrico durante la evisceración. Los microorganismos también pueden transferirse desde la piel o las branquias durante la matanza (FAO/WHO, 2013).

Normalmente la presencia de pequeñas cantidades de histamina en los alimentos no produce efectos adversos para la salud, a excepción de las personas que tienen problemas para metabolizarla. Sin embargo, en algunos casos en los que, la histamina está presente en altas concentraciones, atraviesa la barrera gastrointestinal, en cuyo caso puede producir una intoxicación, cuya intensidad dependerá de las concentraciones circulantes de histamina.

Dicha intoxicación es conocida con el nombre de síndrome escombroides o escombrotismo, debido a que la mayoría de casos se producen por consumo de pescado de la especie *Scombroidea*, que contienen elevadas concentraciones de histidina. Pero también se han identificado otras especies como son *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae* y *Scomberesocidae* con riesgo de producir escombrotismo (FDA, 2011; FAO/WHO, 2013).

En la tabla 2, se muestra un listado de especies de pescado, que representan un riesgo razonable de tener una cantidad elevada de histamina, que pueden ser comercializados en España (FDA, 2011; Diloy, 2019).

Tabla 2: especies de pescado que son susceptibles a contener una cantidad elevada de histamina y que pueden ser comercializados en España. Fuente: FDA, 2011; Diloy, 2019; Resolución de 26 de enero de 2018.

Peto (<i>Acanthocybium solandri</i>)	Anchoa/Boquerones/Bocartes (<i>Engraulis spp.</i>)
Atún lacón (<i>Allothunnus fallai</i>)	Bacoreta (<i>Euthynnus spp.</i>)
Alosa (<i>Alosa spp.</i>)	Pez vela (<i>Istiophorus platypterus</i>)
Anchovetas (<i>Anchoviella spp.</i>)	Bonito de vientre rayado (<i>Katsuwonus pelamis</i>)
Melva (<i>Auxis spp.</i>)	Escolar negro (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>)
Sábalo (<i>Brevoortia spp.</i>)	Aguja negra (<i>Makaira spp.</i>)
Bocona (<i>Cetengraulis mysticetus</i>)	Sardineta (<i>Opisthonema spp.</i>)
Dorado/Lampuga (<i>Coryphaena spp.</i>)	Tasarte (<i>Orcynopsis unicolor</i>)
Anjova (<i>Pomatomus saltatrix</i>)	Escolar (<i>Ruvettus pretiosus</i>)
Bonito (<i>Sarda spp.</i>)	Sardina (<i>Sardina pilchardus</i>)
Sardinelas (<i>Sardinella spp.</i>)	Sardinopas (<i>Sardinops spp.</i>)
Caballa (<i>Scomber scombrus</i>)	Paparda (<i>Scomberesox saurus</i>)
Caritas o Jorobados (<i>Selene spp.</i>)	Medregal (<i>Seriola lalandi</i>)
Espadín (<i>Sprattus spp.</i>)	Medregal (<i>Seriola rivoliana</i>)
Anchovetas indias (<i>Stolephorus spp.</i>)	Marlín (<i>Tetrapturus spp.</i>)
Atún blanco/bonito del norte/albacora (<i>Thunnus alalunga</i>)	Rabil o atún de aleta amarilla (<i>Thunnus albacares</i>)
Atún de aleta negra (<i>Thunnus atlanticus</i>)	Atún del sur (<i>Thunnus maccoyii</i>)
Patudo/Atún de ojo grande/Patudo del atlántico (<i>Thunnus obesus</i>)	Atún rojo/Atún de aleta azul (<i>Thunnus thynnus</i>)
Atún tongol (<i>Thunnus tonggol</i>)	Jurel (<i>Trachurus spp.</i>)

El aumento de histamina en plasma, a causa de un problema en su liberación por el organismo o por su ingesta a través de alimentos que contienen altos niveles de histamina, puede dar lugar a distintos cuadros clínicos. Por lo general, la intoxicación por histamina o escombrotismo es una enfermedad leve con una variedad de síntomas que incluyen

urticaria, náuseas, vómitos, diarrea, erupción cutánea, enrojecimiento y picazón de la piel aunque también puede dar lugar a cuadros clínicos más graves, distintos según sea su origen (Chung-Saint et al., 2014).

En primer lugar, por un exceso de histamina exógena, a través de la alimentación, puede desarrollarse un cuadro de histaminosis tóxica. En segundo lugar, debido a una mala metabolización de histamina exógena por déficit de DAO a nivel intestinal, puede llevar a desarrollar un cuadro de histaminosis enteral, en el que se produce una gran acumulación de histamina. En tercer lugar, debido a la histamina endógena y mediado por Inmunoglobulinas E, se puede producir un proceso alérgico, desencadenado por neuroalérgenos, o bien sin que las IgE medien, lo que produce situaciones de estrés. En cuarto, y último lugar, y provocado también por histamina endógena, se puede desarrollar un cuadro de histaminosis alimentaria no alérgica (HANA), que es una enfermedad multisistémica, no mediada por las IgE, en el que se produce una liberación excesiva de histamina por parte de las células al consumir determinados alimentos (Cebrián, 2018).

Hay que destacar también que los alimentos con alto contenido de otras aminas biógenas como tiamina, cadaverina o tiramina, tienen acción inhibitoria de la DAO, debido a que compiten con la histamina y esto puede potenciar sus efectos adversos sobre el organismo. Al igual que ocurre con el consumo de alcohol y tabaco, que puede incrementar la sensibilidad a las aminas biógenas (Zugasti, 2009; Cebrián, 2018).

Existen también diversos fármacos que son capaces de inhibir la DAO, lo que potencia la toxicidad en una intoxicación histamínica, como son los siguientes: moclobemida, selegilina, isoniazida, acetilcisteína, ambroxol, amitriptilina, cloroquina, ácido clavulánico, metamizol, propafenona, verapamilo, cimetidina y prometazina (Zugasti, 2009).

Por otro lado, la enzima histidina descarboxilasa necesita la presencia de vit B6 como cofactor, por lo que el déficit de vitamina B6, junto con un déficit de cobre y zinc también puede afectar a la actividad de la DAO y por lo tanto a la formación de la histamina (Zugasti, 2009).

La dosis a partir de la cual la histamina es tóxica, y los síntomas que causa su intoxicación son variables, dicha intoxicación normalmente se asocia al consumo de pescado o sus derivados que contienen concentraciones superiores a 500 ppm (Naila et al., 2012, Yesudhasan et al., 2013).

La EFSA ha propuesto un valor de ingesta diaria de 25 – 50 mg de histamina, como dosis máxima segura para personas sanas. Por otro lado, la FAO/OMS establece una dosis máxima de histamina sin efecto adverso observado (NOAEL) de 50 mg (EFSA, 2011; ELIKA, 2019).

En otro estudio la EFSA estimó una exposición general por día a aminas biógenas, basándose en una exposición acumulativa, asumiendo que representa una sobreestimación con un

escenario de alta exposición, debido a que es poco probable que una persona consuma grandes cantidades de todas las categorías de alimentos en el mismo día, y los resultados fueron los siguientes (EFSA, 2011; ELIKA 2019):

Tabla 3: Valores de la ingesta acumulada diaria de histamina en Europa y en España. Fuente: elaboración propia.

	INGESTA ACUMULADA DIARIA (mg/día)
EUROPA (EFSA)	18,6-37,1
ESPAÑA (AESAN)	28,2-36,2

No obstante, el hecho de no haber logrado reproducir la enfermedad al administrar histamina pura a voluntarios que enfermaron al consumir dosis similares en pescado, hace suponer la implicación de algunos potenciadores de toxicidad, cuyo estudio aún no ha llegado a conclusiones determinantes.

Para su control, el Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, establece los límites máximos permitidos para productos de la pesca y derivados (Tabla 4).

Tabla 4: Límites máximos de Histamina en productos de la pesca regulados en la UE. Fuente: elaboración propia.

Categoría de alimentos	Límite máximo permitido	Fase en la que se aplica el criterio
<i>Productos de la pesca procedentes de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina</i>	100-200 mg/kg	Productos comercializados durante su vida útil
<i>Productos de la pesca sometidos a tratamiento de maduración enzimática en salmuera, fabricados a partir de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina</i>	200-400 mg/kg	Productos comercializados durante su vida útil
<i>Salsa de pescado producida por fermentación de productos de la pesca</i>	400 mg/kg	Productos comercializados durante su vida útil

5.2. EVALUACIÓN DE LOS FACTORES DE RIESGO DE INTOXICACIÓN HISTAMÍNICA POR CONSUMO DE PESCADO Y PRODUCTOS DERIVADOS

Para identificar los factores de riesgo asociados con la intoxicación histamínica se ha llevado a cabo una recopilación y revisión de la información epidemiológica disponible en el ámbito de la Unión Europea.

Brotos de intoxicación por histamina

Una brote de ETA es definida como un incidente en el que dos o más personas presentan una enfermedad semejante después de la ingestión de un mismo alimento, y los análisis epidemiológicos apuntan al alimento como el origen de la enfermedad. Los brotes pueden involucrar números diferenciados de casos (OPS/OMS, 2020).

Para realizar el estudio de brotes vamos a comenzar desde el año 2010, agrupando los casos de 2010 a 2014, y a partir de 2015 analizando cada año por separado.

Durante el período de 2010-2014 se notificaron 306 brotes causados por histamina por 12 Estados miembros de la Unión Europea (UE). En 168 de estos brotes la evidencia que implicaba al vehículo alimentario era fuerte, siendo los más frecuentes el pescado y los productos pesqueros (156 brotes) (EFSA, 2017).

En 2015, 7 Estados Miembros de la UE reportaron un total de 80 brotes de intoxicación por histamina, con 437 casos, de los cuales 43 necesitaron hospitalización, lo que representó un aumento en comparación con el año anterior (75 brotes en 2014). En 23 de los 80 brotes reportados, se informó de una fuerte evidencia en el vehículo alimentario implicado, de los cuales 20, con 166 personas afectadas, se asociaron con el consumo de pescado y productos de la pesca. El atún fue el vehículo alimentario específico en 5 de los brotes. Se informó que el entorno en el que se habían producido los casos fue la mayoría en restaurantes o cafeterías, y el resto en escuelas, hogares y comedores laborales (EFSA, 2017).

2016 es el año en el que menos brotes se produjeron, con un total de 16 brotes con evidencia fuerte, notificados por 5 Estados Miembros (Dinamarca, Francia, Alemania, Países Bajos y Suecia), siendo Francia el país que más brotes notificó, con un total de 7 brotes. Entre los 16 brotes agruparon un total de 94 casos, de los cuales solo 1 requirió hospitalización (EFSA, 2016).

En 2017, se produjo un aumento importante en la aparición de brotes por histamina, con un total de 117, afectando a 572 casos y 51 hospitalizados. Del total de brotes, 55 fueron con evidencia fuerte con el vehículo alimentario, siendo éste de nuevo el pescado y los productos

de la pesca. De los 55 brotes con evidencia fuerte, notificados por 8 Estados Miembros, 36 casos necesitaron ser hospitalizados. (EFSA, 2018).

La tendencia positiva en los brotes de histamina observada durante los años 2010-2017 fue interrumpida repentinamente en 2018, con un total de 80 brotes de los cuales 23 fueron vehiculados a través del pescado y los productos de la pesca. En 5 de los 9 Estados Miembros que los reportaron (República Checa, Estonia, Rumania, Eslovaquia y Eslovenia) se informó de la existencia de una gran cantidad de pescados con alto contenido en histamina en comercios minoristas. Por otro lado otros dos Estados Miembros (Rumania y España) notificaron alto contenido en histamina en productos de la pesca sometidos a un tratamiento de maduración enzimática en salmuera, fabricados a partir de las especies asociadas con una gran cantidad de histidina. Una vez realizados los análisis, en el primer caso solo el 0,4% de las muestras superaron los 200 ppm, y en el segundo caso únicamente el 1,6% de las muestras superaron los 400 ppm regulados (EFSA, 2019).



Figura 2: Evolución del número de brotes con evidencia fuerte de histamina en pescado y productos de la pesca (2010-2018). (Fuente: EFSA 2016, EFSA 2017, EFSA 2018, EFSA 2019)

Alertas alimentarias por histamina

Se ha realizado la búsqueda de información sobre las alertas y otras notificaciones causadas por la histamina en la UE. Las alertas son situaciones de riesgo para la salud pública motivadas por un peligro físico, químico o microbiológico contenido en un alimento o en una concentración superior a lo permitido, que provoca que las autoridades sanitarias movilicen distintos medios y recursos para su localización y retirada del mercado y/o el cese de su suministro.

En la búsqueda se han seleccionado los datos que tuvieran implicación con la histamina, a partir del año 2015, y que estuvieran relacionados con la categoría de producto del pescado y sus derivados. En la tabla 5, se pueden ver reflejadas las notificaciones que ha habido cada año, y el tipo de notificación.

Tabla 5: Datos de las notificaciones por histamina publicadas en el portal RASFF entre los años 2015 y 2019. Fuente: elaboración propia.

Año	Total de notificaciones	Alertas	Información para atención	Rechazo de frontera
2015	33	13	18	2
2016	38	11	21	6
2017	43	20	20	3
2018	29	10	18	1
2019	25	8	11	6

Cabe destacar que en lo que llevamos del año 2020, se han comunicado a través del RASFF dos notificaciones causadas por histamina, siendo ambas debidas al pescado y productos derivados del pescado (atún). Una de las notificaciones es una alerta comunicada por Suecia, y la otra es un rechazo de frontera notificada por Portugal.

A continuación se pueden ver recogidas en la tabla 6, las especies de pescado implicadas en las alertas de cada uno de los años.

Tabla 6: Especies de pescado implicadas en las alertas de los años comprendidos entre 2015 y 2019. Fuente: elaboración propia.

Año	Alertas	Especies de pescado implicadas
2015	13	Anchoa (3); Sardina (1); Atún (9)
2016	11	Anchoa (3); Atún (4); Bonito (1); Caballa (1); Pez lagarto (1); Pez merlín (1)
2017	20	Atún (12); Anchoa (3); Sardina (3); Caballa (2)
2018	10	Atún (3); Anchoa (3); Sardina (2); Caballa (1); Pez merlín (1)
2019	8	Atún (6); Anchoa (1); Palometa (1)

Como conclusión del estudio de las alertas causadas por histamina, observando los datos anteriores, puede percibirse una disminución de las alertas en los últimos años, salvo en 2017, que se percibe un pequeño repunte. También se puede observar que el pescado que más notificaciones causa por su alto contenido en histamina es el atún, ya que es el pescado que más alertas ha causado, a lo largo de los últimos años. En relación a los países notificadores, Italia es con una gran diferencia el país que más casos de histamina ha notificado, esto puede deberse a que es uno de los principales países importadores de pescado de la Unión Europea, además de ser un país con un elevado consumo de pescado, siendo de 30,4 kg per cápita (FAO, 2017). En cambio el país del cual provenían los pescados o productos derivados del pescado con contenidos de histamina que superaban los límites legales, es Vietnam. Cabe destacar también que los alimentos involucrados en la mayoría de alertas, son preparaciones de pescado que han sufrido una manipulación previa a su comercialización.

Al realizar el estudio epidemiológico de brotes y alertas, se observaron características comunes entre la mayoría de ellos, bien por la cadena de producción o por la distribución de los alimentos implicados, y que pueden asociarse a factores de riesgo a la hora de producir una intoxicación histamínica. A continuación se resumen dichos factores (EFSA, 2017; Comisión Europea, 2018; FAO/WHO, 2013):

- La cantidad de histamina producida está influenciada por el tiempo que se tarda en bajar la temperatura interna del pescado después de la captura, y depende de factores como el método de captura, el tamaño del pez y el método de enfriamiento, siendo este último de gran importancia, ya que debe ser un método que disminuya la temperatura lo más rápido posible.
- La cantidad de histamina que se forma en los alimentos, está fuertemente influenciada por las características intrínsecas del alimento (pH, actividad de agua, microbiota, etc.) y por las características extrínsecas como son el tiempo y la temperatura de almacenamiento.
- La producción de histamina se ve incrementada debido a un manejo inadecuado del pescado durante el almacenamiento o durante su procesamiento, lo que permite la descarboxilación de la histidina libre por bacterias productoras de la enzima histidina descarboxilasa.
- La aparición de alimentos que superan los niveles legales permitidos, puede verse influida por la duración de la vida útil del producto.
- No puede excluirse que se produzcan abusos de temperatura en más de un punto de la cadena de distribución de alimentos.
- Debido a la naturaleza que tienen los brotes causados por histamina, no pueden relacionarse solo con un punto de contaminación, sino con unas condiciones inadecuadas de temperatura y de higiene que se producen reiteradamente a lo largo de la cadena productiva.

- La concentración de histamina en pescado puede variar considerablemente dentro de un lote, incluso entre diferentes partes del mismo ejemplar, debido a que las bacterias productoras de aminas biógenas están presentes principalmente en las branquias, en la piel y en el tracto gastrointestinal.

5.3. VALORACIÓN DEL RIESGO DE INTOXICACIÓN HISTAMÍNICA EN EL SECTOR DE RESTAURACIÓN COLECTIVA

Para valorar el riesgo de intoxicación por histamina asociado al consumo en el sector de restauración colectiva, se han recopilado datos de consumo de pescado. Asimismo, se ha revisado la información disponible sobre contaminación de pescado y se ha llevado a cabo una prospección del contenido de histamina mediante el análisis laboratorial de muestras de pescado y derivados ofertados como tapas en bares del Tubo de Zaragoza, además de dos muestras que se adquirieron en supermercado.

Hábitos de consumo de pescado y derivados

Según las estimaciones preliminares, en 2016 el consumo mundial de pescado *per cápita* se estimó en 19,7 kg, en donde el pescado representaba el 17,4% del aporte de proteínas animales de la población mundial y el 6,9% de todas las proteínas consumidas (FAO, 2017).

En España, el consumo doméstico de pescado es alrededor de 10 kilos *per cápita*, donde el 64,8% del volumen de pescado se distribuye en hipermercados, supermercados y tiendas autoservicio, siendo el supermercado y las tiendas autoservicio el canal más importante con una participación del 50,7% sobre el volumen total de la categoría. La cuota de la tienda tradicional (31,9%) es mucho mayor que las de las tiendas de descuento y el hipermercado, aunque ha sufrido una reducción del 9,3%. En Aragón el consumo *per cápita* de pescado en el hogar es de 9,32 kg (MAPA, 2019).

Por otro lado, la alimentación fuera de los hogares, a nivel nacional, supone un consumo *per cápita* de 138 kilos/litros por persona, lo que supone casi unos 40 kilos de alimentos por persona, sin contar bebidas y aperitivos. De todos los tipos de alimentos, los pescados suponen un 9,7% del total de alimentos que se consumen fuera del hogar, lo que supone el consumo de casi 4 kilos de pescado por persona (MAPA, 2019).

Contenido de histamina en pescado

En un estudio realizado en China, sobre el contenido de histamina en pescados de la familia *Scombridae*, se analizaron 12 muestras de pescado de Alemania, 9 de Países Bajos, 5 de Noruega, 11 de Tailandia, 3 de Camboya, 13 de Filipinas, 57 de Japón y 19 de China, detectándose histamina en 35 de 159 muestras de pescados, con más de 50 ppm en el 9% de las muestras, cinco superaron los 500 ppm, y de estas, dos superaban los 1000 ppm (Tao et al., 2011).

En Taiwán, se analizaron 42 filetes de mahi-mahi y 17 productos secos de mahi-mahi, y se obtuvo que 4 de las 17 muestras de pescado seco (23,4%) tenían niveles de histamina superiores a 5 mg/100 g, siendo de 68,15 mg/100 g la muestra que mayor contenido presentaba (Lin et al., 2015).

En otro estudio realizado también en Taiwán, en concreto en la isla de Penghu, se analizaron 46 muestras de pescado seco, entre las que se encontraban las siguientes especies de pescados: 3 muestras de jurel (*Auxis tapeinosoma*), 4 de scad redondo (*Decapterus maruadsi*), 9 de jurel de cola lisa (*Selaroides leptolepsis*), 6 de arenque redondo del Pacífico (*Etrumeus teres*), 3 de morena (*Gymnothorax eurostus*), 3 de raya azul (*Dasyatis kuhlii*), 2 de caballa real del Indo-Pacífico (*Scomberomorus guttatus*), 2 de arenque plateado (*Spratelloides gracilis*), 2 de pez conejo plateado (*Siganus fuscescens*), 2 de pez lagarto (*Synodus dermatogenys*), 2 de emperador chino (*Lethrinus haematopterus*), 2 de pez plan (*Pseudorhombus cinnamomeus*), 2 de mero roca (*Epinephelus quoyanus*), 1 de pez limón (*Plectorhinchus flavomaculatus*), 1 de pez gruñido de pollo (*Parapristipoma trilineatum*), 1 de salmonete (*Upeneus japonicus*) y 1 de tiburón tope japonés (*Hemitriakis japonica*). Los resultados revelaron que un 30,4% de las muestras de pescado seco contenían más de 5 mg / 100 g, entre ellas, las 9 muestras de jurel contenían los mayores contenidos de histamina de 6,31-47,90 mg / 100 g (Huang et al., 2010).

Un estudio de Omán, investigó el contenido de histamina en 378 muestras de pescado fresco, 441 muestras de pescado congelado, 290 muestras de pescado enlatado y 24 muestras de pescado seco de especies escombroides y no escombroides. De las 1133 muestras de peces analizadas, se detectó histamina en 551 muestras, con una tasa de detección de aproximadamente 41,8% entre pescado fresco, 61,0% en pescado congelado, 78,9% en pescado enlatado y 91,6% en pescado seco. Los niveles medios de histamina fueron 2,6, 5,8, 3,1 y 104 mg/kg respectivamente. Las anchoas secas contenían los mayores niveles de histamina (Yesudhasan et al., 2013).

Otro estudio, realizado en Brasil, analizó el contenido de histamina en 414 muestras de atún fresco y enlatado, de las cuales se detectó histamina en atún fresco (3,4%) del mercado mayorista y, 46,7% de atún fresco y 46,3% de atún enlatado del mercado minorista. Los niveles

medios fueron 0,19, 1,30 y 4,41 mg / kg, respectivamente. El atún rallado con salsa de tomate y el atún enlatado en aceite fueron las muestras que contenían los niveles más altos, pero aun así todas las muestras cumplían el límite establecido por la FDA (Silva et al., 2011).

Siguiendo con estudios de Brasil, otra investigación sobre muestras de atún, en el que se analizaron 117 filetes de atún fresco, y 92 muestras de atún enlatado, se obtuvo que en ninguna de las muestras de atún fresco se detectó histamina, pero en cambio, en el atún en conserva, se detectó histamina en el 44,6% de las muestras, con unos niveles que varían entre 0,45 a 83,73 mg / kg, por lo que todas las muestras de atún enlatado, aunque se detectó histamina en ellas, estaban por debajo de todos los límites establecidos en la legislación mundial (Evangelista et al., 2016).

A pesar de que las metodologías de análisis son diferentes en cada estudio realizado, se observa que los resultados de histamina, a excepción de casos muy concretos, se encuentran en niveles muy bajos, por lo que no suponen un riesgo alto para la salud de las personas.

Cabe destacar también la gran variación que se percibe al observar los resultados de cada estudio, ya que hay una gran diferencia entre los límites de cuantificación de cada estudio dependiendo de la técnica de análisis empleada.

Estudio prospectivo de histamina en tapas de pescado ofertadas en bares de Zaragoza

Se ha realizado una investigación en Zaragoza, concretamente en la zona del Tubo, que es la más conocida en dicha ciudad para tomar tapas, en las que se recogieron 24 muestras que contenían pescados susceptibles de contener altos niveles de histamina, de 6 establecimientos diferentes. Todas ellas habían sufrido un tratamiento culinario previo.

Del total de 24 muestras, 12 estaban a temperatura de refrigeración en el momento de la compra, en cambio las otras 12 estaban en los mostradores a temperatura ambiente.

Las 24 muestras se analizaron en el laboratorio, según el método descrito en el punto 4.2.3, para cuantificar el contenido en histamina de cada una de ellas. Después de realizar la lectura de las absorbancias, para calcular la concentración, se interpolan dichos valores de absorbancias de cada una de las muestras en la curva patrón, siendo en el eje X el logaritmo en base 10 de las concentraciones de los patrones del kit (3, 10, 30, 100 y 300 ppm) y en el eje Y los valores de absorbancia obtenidos de los patrones, hay que destacar que tanto las muestras como los patrones se analizan por duplicado, por lo tanto los valores a partir de los cuales se hacen los cálculos, son la media de los dos valores obtenidos. Las rectas patrón obtenidas se muestran en las figuras 3 y 4.

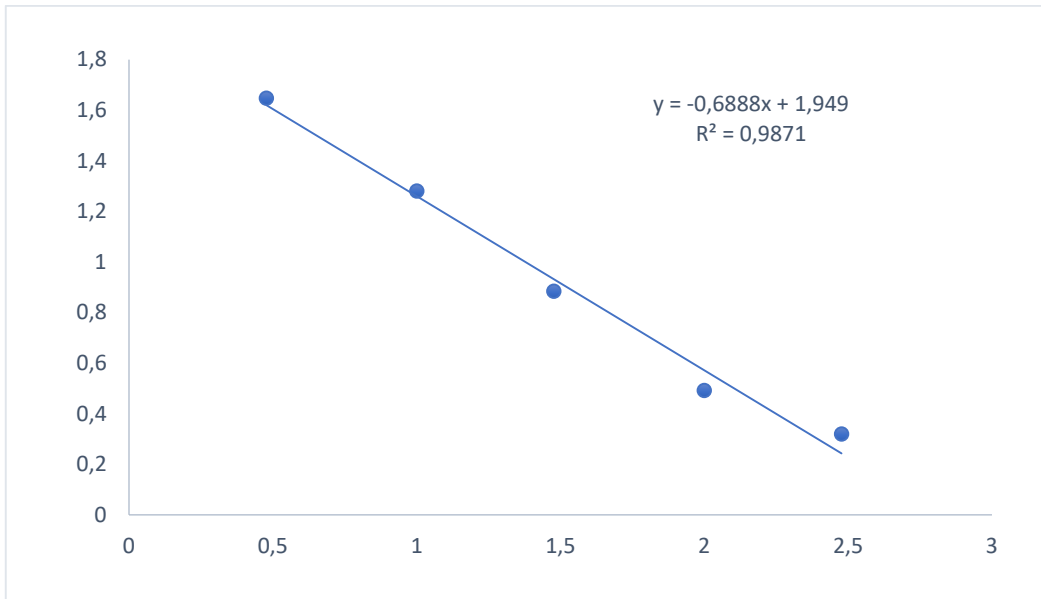


Figura 3: Recta patrón obtenida el primer día de análisis. Fuente: elaboración propia.

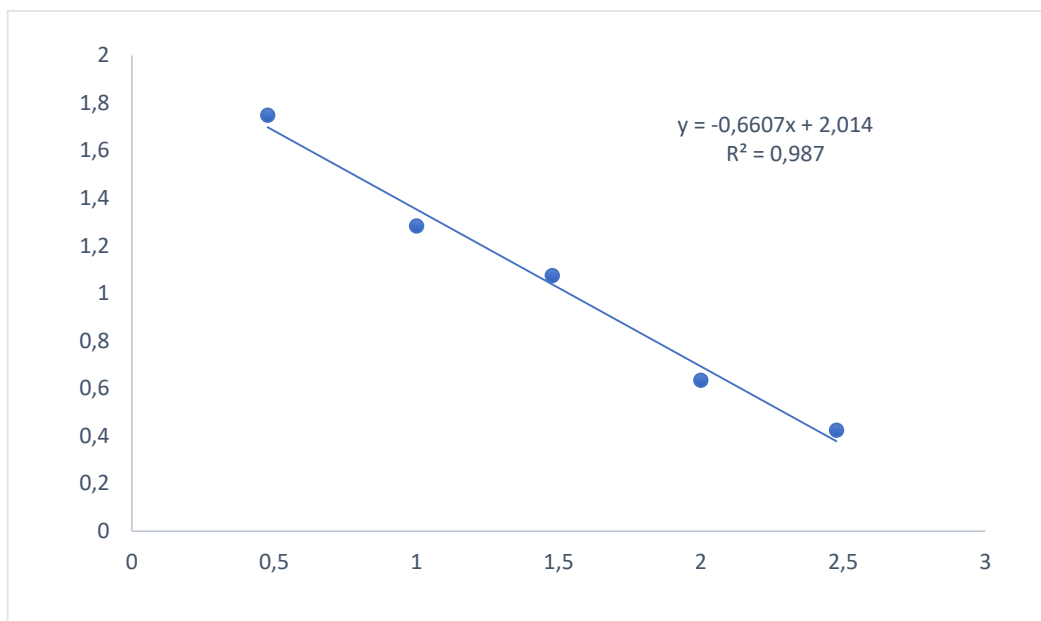


Figura 4: Recta patrón obtenida el segundo día de análisis. Fuente: elaboración propia.

En tabla 7, se agrupan las 24 muestras analizadas según el tipo de producto diferenciándose por colores (Boquerón: naranja claro; Anchoa: verde claro; Arenque: rojo claro; Bonito: azul claro; Atún: morado), y la concentración de histamina (valor medio de los dos resultados) obtenida tras el análisis.

Tabla 7: Tipos de muestras analizadas y concentración de histamina obtenida tras el análisis. Fuente: Elaboración propia.

L.D: Límite de detección 3 ppm

Tipo de productos	Número de muestras	Tipo de producto	Concentración de histamina (ppm)	Límite legal establecido (ppm)
Producto fermentado	M1	Boquerón en aceite	<L.D	400
Producto fermentado	M2	Anchoa en aceite	58,26	400
Producto fermentado	M3	Boquerón frito	<L.D	400
Producto fermentado	M4	Arenque en salmuera	<L.D	400
Producto fermentado	M5	Anchoa en salmuera	4,58	400
Producto fermentado	M6	Bonito en escabeche	<L.D	400
Producto fermentado	M7	Arenque en salmuera	<L.D	400
Producto fermentado	M8	Boquerón en aceite	4,01	400
Producto fermentado	M9	Anchoa en salmuera	<L.D	400
Producto fermentado	M10	Anchoa en aceite	19,30	400
Producto fermentado	M11	Anchoa en salmuera	5,75	400
Producto fermentado	M12	Boquerón en aceite	<L.D	400
Producto fermentado	M13	Anchoa en aceite	6,51	400
Producto fermentado	M14	Atún en escabeche	<L.D	400
Producto fermentado	M15	Anchoa en salmuera	4,75	400

Producto fermentado	M16	Anchoa en aceite	<L.D	400
Producto fermentado	M17	Anchoa en aceite	<L.D	400
Producto fermentado	M18	Anchoa en aceite	<L.D	400
Producto fermentado	M19	Arenque en salmuera	<L.D	400
Producto fermentado	M20	Anchoa en aceite	22,66	400
Producto fermentado	M21	Boquerón en aceite	73,10	400
Producto fermentado	M22	Arenque en salmuera	<L.D	400
Producto fresco	M23	Anchoa fresca	<L.D	200
Producto fresco	M24	Anchoa fresca	<L.D	200

Observando los resultados, el 62,5% de las muestras estaban por debajo del límite de detección (3 ppm). Las demás muestras dieron resultados entre 4,01 ppm y 73,10 ppm, por lo que ninguna de las muestras superaba los límites establecidos por la legislación europea.

La muestra que más concentración de histamina presentó, aunque estaba bastante por debajo del límite legal establecido, fue una banderilla de boquerón que estaba mantenida en un vaso lleno de aceite a temperatura ambiente.

Cabe destacar que la mayoría las muestras que estaban por encima del límite de detección estaban mantenidas en aceite y sin refrigeración, por lo que se corrobora que el mantenimiento a temperatura ambiente es un factor de riesgo de contener niveles más altos de histamina.

5.4. DIRECTRICES PARA EL CONTROL DE HISTAMINA EN EL SECTOR DE RESTAURACIÓN COLECTIVA Y DE VENTA DIRECTA AL CONSUMIDOR.

Con toda la información obtenida a lo largo de este trabajo, se resume a continuación la estrategia de prevención y control del riesgo de histaminosis en el entorno de la restauración colectiva:

1. A la hora de manipular el pescado en cocina, hacer especial hincapié en la manipulación higiénica del mismo, en concreto a la hora de proceder a la evisceración, ya que es una fase clave para evitar altos contenidos en histamina. Para ello, usar distintos cuchillos y utensilios para evitar la contaminación de las partes que menos contenido de histamina contienen, con las que más concentración poseen, como son las branquias, la piel y el tracto gastrointestinal.
2. Por otro lado en la zona externa de la cocina, en la barra o mostrador, se debe evitar tocar los alimentos con las manos a la hora de servirlos, para ello se utilizarán utensilios específicos para dicha acción, así se minimizará la manipulación de los alimentos.
3. Mantener las materias primas a temperatura de refrigeración y/o congelación según el uso previsto, evitando cualquier tipo de variación de la temperatura. Para ello asegurarse en todo momento, que las puertas de las cámaras frigoríficas y de congelación se mantienen los menores tiempos posibles abiertas.
4. Si los productos elaborados van a ser destinados a estar de manera visible por los consumidores en el mostrador, deben estar en vitrina refrigerada.
5. Cumplir la duración de la vida útil establecida para los pescados y productos elaborados a partir de ellos.
6. Cumplir los planes generales de higiene, en especial el de formación del personal, buenas prácticas de fabricación y el del control de la cadena del frío.

6. CONCLUSIÓN

1. A pesar de la gran cantidad de información científica disponible en relación a la histamina, la revisión bibliográfica realizada evidencia que sigue habiendo desconocimiento sobre algunos aspectos de este agente de peligro alimentario, especialmente en el ámbito de consumo de pescado y productos de la pesca en restauración colectiva y en la venta directa al consumidor.
2. Los resultados de la revisión bibliográfica realizada revelan que el riesgo de intoxicación por histamina es bajo, pero que la tendencia de este riesgo ha aumentado en los últimos años debido al alto consumo de pescado y la vulnerabilidad del sector de restauración colectiva ante los brotes alimentarios.
3. Las concentraciones de histamina en las muestras analizadas fueron bajas, con un elevado porcentaje de las muestras (62,5%) con niveles por debajo del límite de detección. En el caso de las muestras positivas, ninguna de ellas superó el contenido máximo de histamina establecido en la legislación para estos productos. A pesar del escaso número de muestras analizadas, los resultados obtenidos corroboran una gestión eficaz de este agente de peligro, en los establecimientos de restauración colectiva de la ciudad de Zaragoza.
4. El peligro de histamina debe ser tenido en cuenta en el ámbito de restauración colectiva y su control debe abordarse a través de los prerrequisitos de higiene propios de este sector alimentario. Para ello, es necesario un mayor desarrollo de instrucciones que incluyan de forma específica recomendaciones para la prevención y el control de este agente de peligro en dicho sector.

CONCLUSIONS

1. Despite the large amount of scientific information available in relation to histamine, the bibliographic review conducted evidence that there is still no knowledge about some aspects of this food hazard agent, especially in the area of consumption of fish and fish products in collective catering and in direct sale to the consumer.
2. The results of the bibliographic review carried out reveal that the risk of histamine poisoning is low, but that the trend of this risk has increased in recent years due to the high fish consumption and the vulnerability of the collective catering sector to food outbreaks.

3. Histamine concentrations in the samples tested were low, with a high percentage of the samples (62.5%) with levels below the detection limit. In the case of positive samples, none of them exceeded the maximum histamine content established in the legislation for these products. Despite the small number of samples analyzed, the results obtained corroborate an effective management of this hazard agent in the collective catering establishments of the city of Zaragoza.
4. The danger of histamine must be taken into account in the field of collective catering and its control must be advocated through the hygiene prerequisites of this food sector. This requires further development of instructions that specifically include recommendations for the prevention and control of this hazard agent in this sector.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Gracias a la elaboración de este trabajo, he aprendido a buscar en numerosas bases de datos, y a organizar y elegir la información que deseaba. Además me ha enseñado a autogestionar el tiempo y la manera de hacer el propio trabajo. Lo que más me ha costado es seleccionar la información y redactarla de manera correcta. El conjunto de hacer el trabajo, me ha parecido muy enriquecedor para mi formación, a la vez que me ha servido para aprender mucho sobre este tema que me parece muy interesante. A su vez, gracias a la parte experimental del mismo, he aprendido a manejarme con autonomía y soltura en un laboratorio.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Carretero, J., Oliver, B., Delgado, P., Medrano, M., Sánchez, F., del Pilar Alonso Vigil, M. and Menéndez, N., (2017). Escombroidosis. Un tipo de intoxicación alimentaria, no una alergia. FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria, 24(5), pp.240-246.
2. Cebrián, A. (2018). Papel de la histamina en la alimentación: revisión bibliográfica de las distintas patologías que puede ocasionar su exceso en el organismo. Trabajo de fin de Máster. Universitat Oberta de Catalunya.
3. Comisión Europea. (2016). The Rapid Alert System for Food and Feed 2015 Annual Report. Luxembourg: Publications Office of the European Union. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2015.pdf [Consultado 13-07-2020].
4. Comisión Europea. (2017). The Rapid Alert System for Food and Feed 2016 Annual Report. Luxembourg: Publications Office of the European Union. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2016.pdf [Consultado 13-07-2020].
5. Comisión Europea. (2018). The Rapid Alert System for Food and Feed 2017 Annual Report. Luxembourg: Publications Office of the European Union. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2017.pdf [Consultado 13-07-2020].
6. Comisión Europea. (2019) RASFF portal. Disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1> [Consultado 11-07-2020].
7. Comisión Europea. (2019). The Rapid Alert System for Food and Feed 2018 Annual Report. Luxembourg: Publications Office of the European Union. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2018.pdf [Consultado 13-07-2020].
8. Diloy, S. (2019). “Aplicación del análisis del riesgo al control de histamina en restauración colectiva”. Trabajo de fin de grado. Universidad de Zaragoza.

9. EFSA. (2020). Acerca de la EFSA. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa> [Consultado 02-07-2020].
10. EFSA (2019). "The European Union One Health 2018 Zoonoses Report". 17(12). DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5926.
11. EFSA, (2018). "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017". 16(12).
12. EFSA. (2017). "Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries. EFSA" Supporting publication, 14 (9), pp. 1-37. DOI: 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1301.
13. EFSA, (2017). "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016". 15(12).
14. EFSA, (2016). "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015". 14(12).
15. EFSA. (2011). "Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods". EFSA Journal, 9 (10), pp: 2393. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2393.
16. ELIKA (2019). Histamina - Elika Seguridad Alimentaria. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/histamina/> [Consultado 7-05-2020].
17. Evangelista, W., Silva, T., Guidi, L., Tette, P., Byrro, R., Santiago-Silva, P., Fernandes, C. and Gloria, M., (2016). Quality assurance of histamine analysis in fresh and canned fish. Food Chemistry, 211, pp.100-106. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.05.035.
18. FAO. (2019). Acerca de. Disponible en: <http://www.fao.org/about/es/> [Consultado 02-07-2019].
19. FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma: FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf> [Consultado 28-07-2020].
20. FAO. (2017) Fishery and Aquaculture Statistics. Roma: FAO. Disponible en: https://ec.europa.eu/knowledge4policy/publication/fao-yearbook-fishery-aquaculture-statistics-2017_en [Consultado 24-07-2020].

21. FAO/WHO. [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. (2013). "Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products". Meeting report. Roma, 23-27 de Julio 2012. Roma: FAO/WHO, pp.138-7.
22. FDA. (2011). Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. (4ª ed.). Florida: Ifas Extension Bookstore.
23. Huang, Y., Liu, K., Hsieh, H., Hsieh, C., Hwang, D. and Tsai, Y., (2010). Histamine level and histamine-forming bacteria in dried fish products sold in Penghu Island of Taiwan. *Food Control*, 21(9), pp.1234-1239. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.02.008.
24. Kovacova-Hanusikova, E., Buday, T., Gavliakova, S. and Plevkova, J., (2015). Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et Immunopathologia*, 43(5), pp.498-506. DOI: 10.1016/j.aller.2015.05.001.
25. Landete, J. M., De Las Rivas, B., Marcobal, A., y Muñoz, R. (2008). "Updated Molecular Knowledge about Histamine Biosynthesis by Bacteria". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48 (8), pp. 697-714. DOI: 10.1080/10408390701639041.
26. Lee, Y., Lin, C., Liu, F., Huang, T. and Tsai, Y., (2015). Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), pp.836-844. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.02.003.
27. Lin, C., Tsai, H., Lin, C., Huang, C., Kung, H. and Tsai, Y., (2014). Histamine content and histamine-forming bacteria in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) fillets and dried products. *Food Control*, 42, pp.165-171. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.02.004.
28. MAPA. [Ministerio de agricultura, pesca y alimentación]. (2019). Informe del consumo alimentario en España 2018. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/20190624_informedeconsumo2018pdf_tcm30-510816.pdf [Consultado 24-08-2020].
29. Mercogliano, R. y Santonicola, S. (2019). "Scombroid fish poisoning: Factors influencing the production of histamine in tuna supply chain. A review" *LWT - Food Science and Technology*, 114, pp.1-7. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108374.

30. Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., Meerdink, G. and Morton, R., (2012). Prediction of the amount and rate of histamine degradation by diamine oxidase (DAO). *Food Chemistry*, 135(4), pp.2650-2660. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.07.022.
31. Pino-Ángeles, A., Reyes-Palomares, A., Melgarejo, E., y Sánchez-Jiménez, F. (2012). "Histamine: an undercover agent in multiple rare diseases?" *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 16(9), pp. 1947–1960. DOI:10.1111/j.1582-4934.2012.01566.x.
32. Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338 de 22 de diciembre de 2005.
33. Resolución de 26 de enero de 2018, de la Secretaría General de Pesca, por la que se publica el listado de denominaciones comerciales de especies pesqueras y de acuicultura admitidas en España. *Boletín Oficial del Estado*, nº 53, de 01 de Marzo de 2018.
34. Rosell, A (2015). Aspectos clínicos y nutricionales de la intolerancia a la histamina en pacientes pediátricos con sintomatología digestiva crónica. Tesis doctoral. Universitat de les Illes Balears.
35. Sanchez, J., (2020). OPS/OMS | Enfermedades Transmitidas Por Alimentos (ETA). Pan American Health Organization / World Health Organization. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es [Consultado 10-08-2020].
36. Silva, T., Sabaini, P., Evangelista, W. and Gloria, M., (2011). Occurrence of histamine in Brazilian fresh and canned tuna. *Food Control*, 22(2), pp.323-327. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.07.031.
37. Tao, Z., Sato, M., Zhang, H., Yamaguchi, T. and Nakano, T., (2011). A survey of histamine content in seafood sold in markets of nine countries. *Food Control*, 22(3-4), pp.430-432. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.09.018.
38. Yesudhasan, P., Al-Zidjali, M., Al-Zidjali, A., Al-Busaidi, M., Al-Waili, A., Al-Mazrooei, N. and Al-Habsi, S., (2013). Histamine levels in commercially important fresh and processed fish of

Oman with reference to international standards. *Food Chemistry*, 140(4), pp.777-783. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.030.

39. Zugasti, A. (2009). "Intolerancia alimentaria". *Endocrinología y Nutrición*, 56 (5), pp. 241-250 DOI: 10.1016/S1575-0922(09)71407.