



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Aplicación del análisis de riesgo al control de histamina en restauración colectiva

Application of risk analysis to histamine control in catering mass

Autor/es

Sergio Diloy Monge

Director/es

Susana Lorán Ayala
Pilar Conchello Moreno

Facultad de Veterinaria

2019

Índice:

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN: | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN:..... | 2 |
| 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS: | 5 |
| 4. METODOLOGÍA: | 5 |
| 4.1.METODOLOGÍA DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:..... | 6 |
| 4.1.1. Definición de los criterios de búsqueda: | 6 |
| 4.1.2. Selección de las fuentes de información: | 6 |
| 4.1.3 Clasificación y análisis de la información consultada: | 9 |
| 4.2. METODOLOGÍA DE LA PARTE EXPERIMENTAL: | 10 |
| 4.2.1. Definir los criterios de la toma de muestras:..... | 10 |
| 4.2.2. Toma de muestras: | 11 |
| 4.2.3. Análisis de las muestras: | 11 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:..... | 13 |
| 5.1. EVALUACIÓN DEL RIESGO: | 13 |
| 5.1.1. Identificación del peligro: | 13 |
| 5.1.2. Caracterización del peligro: | 17 |
| 5.1.3. Evaluación de la exposición:..... | 19 |
| 5.1.3.1. Análisis de histamina mediante enzimoimmunoensayo competitivo..... | 22 |
| 5.1.4. Caracterización del riesgo: | 25 |
| 5.2. GESTIÓN DEL RIESGO: | 27 |
| 5.3. COMUNICACIÓN DEL RIESGO:..... | 33 |
| 6. CONCLUSIONES:..... | 35 |
| 7. VALORACIÓN PERSONAL: | 36 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA:..... | 37 |
| 9. ANEXOS:..... | 41 |

1. RESUMEN:

En el presente trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica relativa al análisis de riesgo de histamina en el sector de la restauración, uno de los principales motores de la economía española y uno de los sectores más propensos a causar brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos. El análisis de riesgos es una de las múltiples herramientas que se usan actualmente para salvaguardar la seguridad alimentaria cuyo objetivo es generar un nivel elevado de protección de la salud. Un análisis de riesgo está compuesto por tres etapas, una evaluación del riesgo, una gestión del riesgo y una comunicación del riesgo.

Unido a esto se han analizado 21 muestras de 14 establecimientos diferentes para conocer el contenido en histamina en tapas de pescado servidas en la localidad de Zaragoza. Ninguna de las muestras que se analizaron por medio de un kit rápido basado en un enzimoimmunoensayo competitivo superó el límite legal establecido.

La búsqueda de una mejora en la gestión del riesgo me ha llevado a concluir que actualmente no hay una tecnología o un proceso capaz de destruir la histamina o reducirlas hasta niveles tolerables una vez preformada, por lo que se deben establecer estrategias de prevención y control eficaces para evitar que lleguen hasta el consumidor alimentos que causen una intoxicación. Entre estas estrategias destacan la modificación del sistema de autocontrol del sector de la restauración, especialmente en los planes de formación de los manipuladores, control de la cadena de frío, homologación de proveedores, buenas prácticas de fabricación y manipulación. A todo esto y dado que las políticas de seguridad alimentarias asumen la responsabilidad compartida entre establecimientos, autoridades y consumidores, se debe mantener la continua vigilancia para evitar posibles brotes y poner en peligro la salud del consumidor.

ABSTRACT:

In the present work, a bibliographic review has been carried out regarding the histamine risk analysis in the catering sector, one of the main engines of the Spanish economy and one of the most likely sectors to cause outbreaks of diseases transmitted by foods. Risk analysis is one of the many tools currently used to safeguard food security whose objective is to generate a high level of protection of people's health. A risk analysis consists of three stages, a risk assessment, a risk management and a risk communication.

Together with this, 21 samples from 14 different establishments have been analyzed to know the histamine content on fish “tapas” served in the city of Zaragoza. None of the samples that were analyzed by a rapid kit based on a competitive enzyme immunoassay, exceeded the established legal limit.

The search for an improvement in risk management has led me to conclude that there is currently no technology or process capable of destroying histamine or reducing them to tolerable levels once preformed, so effective prevention and control strategies must be established to prevent food that causes intoxication from reaching the consumer. These strategies include the modification of the self-control system of the catering sector, especially in the training plans of the manipulators, control of the cold chain, approval of suppliers, good manufacturing and handling practices. To all this and given that food safety policies assume shared responsibility among establishments, authorities and consumers, continuous vigilance must be maintained to avoid possible outbreaks and endanger the health of the consumer.

2. INTRODUCCIÓN:

La histamina es una sustancia inflamatoria que pertenece al grupo de las aminas biógenas. Se trata de un compuesto químico que se puede producir de forma natural en el cuerpo y es liberada en reacciones alérgicas frente a diversos alérgenos como polvo, polen, moho etc; actuando como un potente vasodilatador. Cuando los niveles en sangre aumentan, aparecen los síntomas de una crisis alérgica (Fernández-Salguero y Mackie, 2004).

Asimismo la histamina también se puede sintetizar en los alimentos por la acción de distintas especies de microorganismos, debido a una descarboxilación de la histidina (un aminoácido que forma parte de las proteínas de los seres vivos) por la enzima histidina decarboxilasa (HDC) durante procesos de fermentación o descomposición. Esto puede producirse en distintos alimentos tales como pescado, embutidos, queso, vino, cerveza etc. y ser ingerida a través de su consumo (EFSA, 2011; Pino-Ángeles *et al.*, 2012).

Una vez que la histamina se ha generado en el alimento, es muy difícil su eliminación debido a que es una sustancia termorresistente. Es por ello que las medidas preventivas para evitar su formación, tales como una manipulación higiénica del alimento, unido al mantenimiento de la cadena de frío, son vitales para garantizar un bajo contenido en histamina en los alimentos (FAO/WHO, 2013).

Los alimentos más propensos a contener elevados niveles de histamina, además de los alimentos fermentados, suelen ser aquellos con un gran contenido en histidina. Este es el caso de los pescados frescos, sobre todo pescado azul de la familia *Scombridae* (atún, caballa, bonito) aunque también se puede dar en pescados de la familia *Clupeidae* (sardina, arenque, boquerón) y otras especies. Debido a su termorresistencia, la histamina puede encontrarse en conservas y semiconservas de estos productos si se ha formado previamente (EFSA, 2011).

El consumo de alimentos con cantidades elevadas de histamina da lugar a una intoxicación llamada síndrome escombroides (debido a que la mayoría de casos se asocian al consumo de especies de pescado de la familia de *Scombroidae*), aunque actualmente se utilizan los términos intoxicación histamínica o histaminosis (FDA, 2011).

Los síntomas de esta intoxicación pueden aparecer entre unos minutos o hasta varias horas después de la ingesta, pero normalmente antes de que se cumplan las 12 horas. Algunos de estos síntomas son: picor de la garganta, sudor facial, náuseas y vómitos, dolores de cabeza, enrojecimiento y edemas cutáneos. Los síntomas suelen ser de carácter leve y desaparecen entre las 12 y las 24 horas. No hay casos de mortalidad registrados debido a esta intoxicación (FDA, 2011; FAO/WHO, 2013).

En la mayoría de los casos, el consumo de productos de la pesca en mal estado es la causa principal de los brotes y alertas alimentarias relacionadas con la histamina, especialmente el atún. La causa de la intoxicación suele estar relacionada con la pérdida de la cadena de frío a lo largo del transporte desde el origen hasta el consumo. Es por ello que la prevención de futuros brotes requerirá que los pescadores, las autoridades sanitarias competentes, restaurantes y profesionales de la medicina trabajen juntos para diseñar normas internacionales de seguridad y aumentar la conciencia acerca de la intoxicación histamínica (Feng, Teuber, y Gershwin, 2016).

En este sentido cabe destacar el aumento progresivo de notificaciones de histamina a través del sistema RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) coordinado por la Unión Europea, entre 1979, año de creación de esta red, y 2019. En estas notificaciones se incluye alertas, información para atención, información de seguimiento y rechazo en frontera. Entre 1979 y 2001 sólo hubo 42 notificaciones por histamina, sin embargo entre 2002 y 2019 se han llegado a sumar un total de 626 notificaciones, siendo los pescados como el atún y derivados los principales responsables (Leuschner *et al.*, 2013; D. Amino *et al.*, 2018; Comisión Europea, 2019).

Unido a esto, cabe destacar que el sector de la restauración en España es uno de los más activos y uno de los motores de la economía. Actualmente existen en torno a 280.000 locales de restauración en nuestro país. De hecho, España es el país con mayor densidad de bares del mundo, cerca de 1 bar por cada 175 personas (MAPAL software, 2018).

Los últimos datos de brotes alimentarios en España sugieren que el problema reside en la alta densidad de locales dedicados a la restauración. Entre 2008 y 2011 el 54 % de los brotes de transmisión alimentaria se produjeron en el sector de la restauración colectiva, incluyendo restaurantes, hoteles, bares, escuelas, guarderías, geriátrico, campamento y otros colectivos, mientras que sólo el 37 % se produjo en el ámbito familiar (ISC, 2014).

De igual modo la cifra de afectados que puede generar un brote en un establecimiento dedicado a la restauración y en un domicilio familiar es significativamente desigual. En 2017 del total de los 276 brotes causados por intoxicaciones alimentarias, 68 se causaron en el ámbito de la restauración, los cuales produjeron 512 afectados, y 168 en el domicilio familiar, causando 277 afectados. Según estas cifras, esto sugiere que un brote en el domicilio familiar produce 1,64 casos, mientras que el sector de la restauración puede producir 7,5 casos por brote (DGSP, 2017).

Dado el creciente aumento de alertas y brotes desencadenados por productos con altas concentraciones de histamina, y teniendo en cuenta que uno de los sectores más susceptibles de causar brotes de histaminosis es la restauración debido al gran número de comensales que trata a diario, es necesaria la implementación de normas que afecten directamente a este sector.

La UE basa sus políticas en materia de seguridad alimentaria en la aplicación del análisis del riesgo, mediante el desarrollo de sus tres componentes: evaluación, gestión y comunicación del riesgo (FAO, 2004). Desde esta perspectiva, la aplicación de medidas para prevenir el riesgo de intoxicación histamínica por consumo de productos de la pesca, debe basarse en una evaluación del riesgo. Para ello, en primer lugar es necesario establecer la naturaleza del agente de peligro, caracterizar sus efectos adversos y evaluar la exposición a dicho agente para así caracterizar el riesgo, es decir, estimar la probabilidad de que se produzca un efecto nocivo derivado de la exposición al peligro y su gravedad para la población.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:

La presencia en los alimentos de concentraciones elevadas de histamina puede desencadenar intoxicaciones alimentarias cuya incidencia se está incrementando en los últimos años.

Ello puede ser resultado de una mala conservación y manipulación de los productos de la pesca en los diferentes eslabones de la cadena de distribución. Este hecho unido a la gran estabilidad al calor que posee este agente químico hace que el sector de la restauración sea especialmente vulnerable a la presencia de este peligro, ya que no es capaz de reducir la cantidad del agente y pueden seguir aumentando los niveles de histamina si no se conserva de forma adecuada y no se tiene implantado unas buenas estrategias de prevención y control.

El **objetivo** principal de este Trabajo de Fin de Grado es llevar a cabo una actualización de las estrategias de prevención y control del peligro de histamina en el sector de la restauración, mediante la aplicación de los principios de análisis del riesgo. Para ello se establecen los siguientes objetivos específicos:

1. Recopilar y analizar la información científica sobre la evaluación del riesgo de histaminosis por consumo de pescado a través de la identificación y caracterización del peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo actual.
2. Evaluar la presencia de histamina en productos pesqueros listos para el consumo en establecimientos de restauración colectiva de la ciudad de Zaragoza.
3. Analizar las medidas de gestión del riesgo que se está llevando a cabo en el sector y proponer la aplicación de estrategias que permitan una mejora para la prevención y control del peligro.
4. Análisis de la herramienta de comunicación del riesgo de histamina en productos de la pesca.

4. METODOLOGÍA:

Dado el gran número de archivos y artículos que se publican día a día, un estudiante que realice un TFG debe ser capaz de reconocer y extraer información de aquellos artículos que tengan un contenido y unas características útiles y de buena calidad para la elaboración de la memoria. Para ello me he basado en los apartados que propone la Guía

de herramientas y pautas para un buen TFG: Ciencia y Tecnología de los alimentos 2018-19 (Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, 2018).

La revisión bibliográfica a realizar se lleva a cabo en tres fases:

- Definición de los criterios de búsqueda: periodo temporal e idioma, tipología de los documentos y palabras clave.
- Selección de las fuentes de información.
- Clasificación y análisis de la información consultada

A su vez, dado que el trabajo posee una parte experimental, a pesar de no constituir el grueso del trabajo tiene una metodología específica detallada en el punto 4.2.

Finalmente, con toda la información obtenida se procede a la discusión y descripción de los resultados involucrados en mi búsqueda y análisis de los mismos.

4.1. METODOLOGÍA DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

4.1.1. Definición de los criterios de búsqueda:

El periodo temporal seleccionado para la búsqueda de información se centra en artículos publicados a partir del año 2000, acotando la *Búsqueda avanzada* para este periodo temporal, seleccionando documentos escritos en español e inglés. Sin embargo monografías y artículos científicos anteriores a esa fecha que a mi parecer son relevantes han sido seleccionados de igual modo.

Con respecto a la tipología de documentos seleccionados, en esta revisión se incluyen: monografías, congresos y conferencias, tesis doctorales, trabajos de fin de grado y master, artículos de revista en papel, artículos de revista electrónica, entradas a trabajos de consulta en línea, guías, artículos de periódico digital, documentos web con autor, sitios web y legislación (española y europea).

Para seleccionar los criterios de búsqueda, se han recopilado las siguientes palabras clave en español e inglés: “histamina”, “histamine”, “síndrome escombroides”, “escombrotóxina”, “aminas biógenas”, “biogenic amines”, “histamine content”, “alerta”, “alert”, “brote”, “outbreak”, “atún”, “tuna”, “aminas biógenas en pescado”, “análisis del riesgo”, “análisis del riesgo de histamina”, “restauración”, “restaurante”, “restaurant”, “catering”, “brotes alimentarios en restauración colectiva”.

4.1.2. Selección de las fuentes de información:

Se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica en las siguientes bases de datos:

- Alcorze: Se trata de un buscador (<http://alcorze.unizar.es>) que permite la búsqueda simultánea en la mayoría de los recursos de información de la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza (BUZ), incluyendo fuentes internas como el catálogo de la biblioteca, el repositorio institucional Zaguán, la Lista AtoZ etc., como externas (bases de datos), tanto en formato impreso como electrónico. También permite localizar publicaciones en acceso abierto (Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, 2019).
- ScienceDirect: Es una plataforma electrónica sobre ciencia y tecnología de la empresa Elsevier que permite la búsqueda y recuperación de artículos de las revistas y libros de la propia editorial (actualmente tiene más de 3800 revistas y 35000 libros). Representa aproximadamente el 25% de la producción científica mundial, con más de 9 millones de artículos en las áreas científica, tecnológica y médica (Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, 2019).
- SCOPUS: Es un portal sobre ciencia y tecnología de la empresa Elsevier. Incluye artículos de revistas (más de 21000, de más de 5000 editores), libros, congresos y conferencias. Además, esta base de datos contiene herramientas inteligentes para rastrear, analizar y visualizar la investigación, para identificar las tendencias emergentes y aumentar la visibilidad de la investigación. También permite la consulta de resultados de oficinas de patentes (USPTO, WIPO, EPO, JPO, UKIPO) (Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, 2019).
- Google Académico (Google Scholar): Es un buscador que permite localizar documentos de carácter académico como artículos, tesis, libros, patentes, actas de congresos y resúmenes. Reúne la información procedente de diversas fuentes como editoriales, asociaciones profesionales, universidades y otras organizaciones académicas.

Otras bases de datos consultadas han sido aquellas relacionadas con la legislación vigente. Entre ellas destacan el BOE (Boletín Oficial del Estado), y Eur-Lex (El acceso al derecho de la Unión Europea). Sus sedes Web están disponibles en (<https://www.boe.es>) y (<https://eur-lex.europa.eu>), respectivamente.

Para llevar a cabo una recopilación de alertas y brotes alimentarios en lo referente a la histamina, se han consultado las bases de datos que nos ofrecen RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) y SCIRI (Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de

Información) y sus informes anuales de los últimos 10 años. El RASFF, creado en 1979, consiste en una red de puntos de contacto entre la Comisión Europea, la EFSA, y los estados miembros de la UE para intercambiar información de forma clara y estructurada. Se estableció para proporcionar a las autoridades una herramienta eficaz para intercambiar información sobre las medidas tomadas en respuesta a los riesgos graves detectados en relación con los alimentos o los piensos. Este intercambio de información ayuda a los estados miembros a actuar más rápidamente y de manera coordinada en respuesta a una amenaza para la salud causada por alimentos o pienso (Comisión Europea, 2018).

La Red SCIRI fue creada en 1987 y está coordinada por la agencia Española de seguridad alimentaria y nutrición, actualmente AESAN. En ella participan las 17 Comunidades Autónomas (CCAA) y las ciudades autónomas Ceuta y Melilla, la Comisión Europea y otras autoridades competentes en función del riesgo. Esta red integra en el mismo sistema otras redes de alerta rápida alimentaria como el RASFF, a nivel europeo o a nivel internacional INFOSAN (*International Food Safety Authorities Network*) (AESAN, 2017).

Por último también se ha consultado en los buscadores avanzados que nos ofrecen las autoridades de seguridad alimentaria.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura): Está formada por 194 Estados miembros, dos miembros asociados y una organización miembro, la Unión Europea. Su objetivo es lograr la seguridad alimentaria para todo el mundo y al mismo tiempo garantizar el acceso regular a alimentos suficientes y de buena calidad para llevar una vida activa y sana (FAO, 2019).
- EFSA (European Food Security Authority): Se trata de una autoridad financiada por la Unión Europea que opera de manera independiente de las instituciones legislativas y ejecutivas europeas (Comisión, Consejo, Parlamento) y de los Estados miembros de la UE. El sistema europeo de seguridad alimentaria mantiene por separado la responsabilidad de la evaluación del riesgo (ciencia) y de la gestión del riesgo (política). La EFSA es responsable de la evaluación del riesgo, y tiene el deber de comunicar sus descubrimientos científicos al público (EFSA, 2019).

- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición): Se trata de un organismo independiente pero adscrito al actual Ministerio de sanidad, consumo y bienestar social. El objetivo de esta agencia es garantizar la seguridad de los productos y defender los intereses económicos de los consumidores fomentando y promoviendo sus derechos. Debe garantizar la seguridad alimentaria ofreciendo información objetiva a los consumidores y agentes económicos del sector agroalimentario español. Por último, entre las funciones de AESAN se encuentran la planificación, coordinación y el desarrollo de estrategias y actuaciones que fomenten la información, educación y promoción de la salud en el ámbito de la nutrición (AESAN, 2019a).
- ACSA (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria): Se trata de un área especializada en garantizar la seguridad alimentaria en Cataluña dentro de la Agencia de Salud Pública de Cataluña. Su objetivo es actuar como centro referente en Cataluña en la evaluación, la comunicación y el asesoramiento de los beneficios y riesgos para la salud relacionados con los alimentos y colaborar con las autoridades competentes en el ámbito nacional y europeo, con las administraciones públicas, con los distintos sectores que inciden, directa o indirectamente, en la seguridad alimentaria y con las organizaciones de consumidores y usuarios en Cataluña (ACSA, 2019).
- ELIKA (Fundación Vasca Para la Seguridad Agroalimentaria): Es una fundación creada por el Gobierno Vasco para la mejora de la seguridad alimentaria en Euskadi. Su función es el asesoramiento científico y técnico a las administraciones en el despliegue de la política de Seguridad Alimentaria a nivel nacional y europeo. Debe brindar apoyo y asistencia a los operadores de la cadena alimentaria facilitando la actuación y comunicación con las autoridades competentes en Materia de Seguridad Alimentaria. También tiene la responsabilidad de difundir información en temas actualidad en lo referente al tema de la Seguridad Alimentaria para los consumidores en el País Vasco (ELIKA, 2018).

4.1.3 Clasificación y análisis de la información consultada:

Una vez definidos los criterios de búsqueda y seleccionadas las bases de datos se procede a clasificar y analizar la información consultada en busca de artículos útiles para la elaboración de la memoria. Esta búsqueda de bibliografía útil consta de tres etapas:

1º Búsqueda inicial: Se realizó una búsqueda inicial para tener una visión general sobre el tema de aminas biógenas, en particular histamina, que me permitiera identificar y caracterizar el peligro. Se buscó información acerca de este peligro en los buscadores avanzados que nos ofrecen las bases de datos nacionales e internacionales nombradas anteriormente.

2º Búsqueda sistemática: Tras tener una idea general del tema se consultaron artículos y monografías más específicas utilizando para ello las bases de datos Alcorze, Scienedirect, Scopus y Google Académico. Se obtuvieron de este modo datos específicos sobre aquellos campos en los que la información necesitaba ser más técnica y complementaba a la información recopilada previamente. En las tablas del Anexo I se puede visualizar las estrategias de búsqueda y los criterios de selección utilizados.

3º Búsqueda interna: Tras recopilar toda la información posible acerca del tema en cuestión, se procedió a la selección de artículos y monografías referenciados dentro de los artículos de los que disponía que me llevaron a nuevos artículos que finalmente se seleccionaron y se introdujeron en el TFG.

4.2. METODOLOGÍA DE LA PARTE EXPERIMENTAL:

4.2.1. Definir los criterios de la toma de muestras:

La zona seleccionada para la toma de muestras fue la zona centro de Zaragoza conocida popularmente como “El Tubo”. Se seleccionó dicha zona porque reúne una gran cantidad de bares de diferentes categorías y tamaños, además de tener una gran afluencia de gente.

Los establecimientos seleccionados son aquellos con servicio de bebidas, acompañadas o no de tapas y raciones. 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, los establecimientos seleccionados pertenecen al Grupo I (bares, tabernas y cervecerías entre otros). No se incluirán restaurantes ni cafeterías que formen parte del Grupo II.

El tipo de muestra seleccionado se corresponde con preparaciones culinarias que tienen como base pescado especialmente susceptible de tener un gran contenido en histamina como atún, bonito, caballa, sardinas, anchoas y boquerones.

4.2.2. Toma de muestras:

Finalmente se recogieron 21 muestras de 14 establecimientos diferentes incluyendo: atún (5 en escabeche y 5 crudo), sardinas (1 marinada y 2 en salmuera), boquerones (1 conservados en aceite y 2 en vinagre), anchoas (3 en salmuera) y arenque (1 en salmuera y 1 en aceite). Todas se mantuvieron refrigeradas en nevera portátil y se conservaron en congelación hasta su análisis.

4.2.3. Análisis de las muestras:

El análisis se realiza por un método de enzimoimmunoensayo competitivo, desarrollado por la empresa BioSystem, para el análisis cuantitativo de histamina en diferentes tipos de peces de forma rápida. La histamina en la muestra es cuantitativamente derivatizada a N-acilhistamina mediante el uso de un reactivo acilante.

Composición del kit comercial

- 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.
- Soluciones patrón: 8 botes de 4 mL a una concentración de 0, 3, 10, 20, 30, 50, 100 y 300 ppm de histamina.

Todos los componentes del Kit deben ser guardados en refrigeración hasta su uso.

Preparación de las muestras

En primer lugar se realizó una descongelación de las muestras en refrigeración (2-8 °C). Se pesaron 10 g de estas en balanza (modelo KERN 440-45N) y se añadieron 240 mL de agua destilada. Se trituró la muestra con la ayuda de una batidora durante 2 minutos. La muestra se filtró en un matraz con la ayuda de un filtro de pliegues. Se prepararon las muestras por duplicado.

Procedimiento

El kit permite realizar una determinación semicuantitativa o cuantitativa. Se optó por la segunda para disponer de datos más precisos. Para ello fue necesario realizar una curva de calibración de concentraciones crecientes de 0, 3, 10, 30, 100 y 300 ppm, siguiendo el proceso que se detalla a continuación, que es el mismo que el usado para las muestras de pescado. El proceso consta de tres fases: Acilación, Test Elisa, Cálculos.

- Acilación:

Se añadieron 50 μ l del extracto de la muestra filtrada en los respectivos pocillos de la Placa de Reacción. Posteriormente se añadieron 1,5 mL de tampón acilante y 50 μ l de reactivo acilante a los pocillos. El color virar a rosa tras la adición de este último reactivo. La placa de reacción se agitó manualmente y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente en una campana húmeda.

- Test Elisa:

Se añadieron 50 μ l de las muestras aciladas en los pocillos de la microplaca de histamina y a continuación se pipetearon 100 μ l de antisuero conjugado. Se agitó la placa unos segundos antes de su incubación en campana húmeda (10 minutos a temperatura ambiente). Posteriormente el contenido se desechó y se lavó tres veces con 300 μ l de Tampón de lavado.

A continuación se pipetearon 100 μ l de sustrato llevando de nuevo a incubación en campana húmeda durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se añadieron 100 μ l de la solución de paro y se llevaron a incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente en campana húmeda.

Finalmente se leyó la absorbancia por duplicado a 450 nm en todos los pocillos mediante el uso de un Lector Elisa (modelo Multiskan EX). Se realizó la media de ambas lecturas y la media con sus respectivos duplicados.

- Cálculos:

Para la representación gráfica de los resultados, se dispusieron en el eje Y los valores de la absorbancia (media de los duplicados) y en el eje X las correspondientes concentraciones de histamina en escala logarítmica.

La concentración de histamina en las muestras se calculó por interpolación de los valores la absorbancia.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. EVALUACIÓN DEL RIESGO:

La Evaluación del Riesgo, uno de los tres componentes del Análisis del Riesgo, es un proceso con fundamento científico que consta de las siguientes fases:

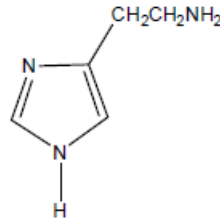
- Identificación del peligro: Identificación de los agentes biológicos, químicos y físicos capaces de causar efectos adversos para la salud y que pueden estar presentes en un alimento o grupos de alimentos en particular.
- Caracterización del peligro: Evaluación cualitativa y/o cuantitativa de la naturaleza de los efectos adversos para la salud asociados con el peligro en cuestión.
- Evaluación de la exposición: Evaluación cualitativa y/o cuantitativa de la ingestión probable de agentes biológicos, químicos y físicos mediante los alimentos, así como de la exposición procedente de otras fuentes, cuando proceda.
- Caracterización del riesgo: Proceso de determinación de la estimación cualitativa y/o cuantitativa, incluidas las incertidumbres que conlleva, de la probabilidad de aparición y gravedad de efectos adversos conocidos y potenciales para una población dada, sobre la base de la identificación del peligro, la caracterización del mismo y la evaluación de la exposición (FAO, 2004).

5.1.1. Identificación del peligro:

La histamina fue descubierta en 1910 por Henry H. Dale. Es un agente químico incluido dentro del grupo de aminas biógenas, bases orgánicas nitrogenadas no volátiles de bajo peso molecular, derivadas de la descarboxilación de los aminoácidos correspondientes, en este caso la histidina (Álvarez y Moreno-Arribas, 2014). Desde el punto de vista químico, la histamina se formula como 2-[4-imidazol]-etilamina y su fórmula es $C_5H_9N_3$ (Figura 1). Está compuesta por un anillo imidazólico y un grupo etilamino como cadena lateral (Rosell, 2015).

Figura 1: Estructura química de la histamina

Fuente: (EFSA, 2011)



La histamina suele formarse de forma natural en el cuerpo humano. Los valores normales de histamina en sangre suelen estar comprendidos entre 25 y 130 mg/L, y si éstos aumentan hasta valores críticos puede peligrar la salud del individuo (Nelson y Cox, 1987). La histamina se genera en el cuerpo humano gracias a la acción de la enzima histidina descarboxilasa (HDC) y en la que participa el fosfato-5-piridoxal (vitamina B6) como cofactor. Esta se sintetiza como consecuencia de una respuesta alérgica y actúa como neurotransmisor en las reacciones sinápticas. Se degrada cuando se alcanza una cantidad suficiente de histamina en sangre. La histamina se suele almacenar en el cuerpo mediante el complejo histamina-heparina en las glándulas secretoras de algunas células neuronales, células del sistema inmunológico y células de la mucosa gástrica; a la espera de ser liberada (FAO/WHO, 2013).

Una vez liberada al torrente sanguíneo la histamina se une a cuatro tipos de receptores (H1, H2, H3 y H4) de las membranas celulares de diferentes tipos de células. Estos receptores, a nivel general están presentes en músculo liso, endotelio y sistema nervioso central (H1), células parietales de mucosa gástrica (H2), sistema nervioso central (H3) y sistema inmunohematológico (H4) (Pino-Ángeles *et al.*, 2012). Entre las múltiples respuestas que pueden ocurrir están el aumento de la vasopermeabilidad y la vasodilatación (Rosell, 2015).

Por otro lado, la histamina puede llegar al cuerpo humano por vía exógena a través de los alimentos. Algunos grupos de microorganismos durante su crecimiento producen la enzima HDC. Sin embargo, la HDC bacteriana ha sido ampliamente estudiada y caracterizada en diferentes organismos y se han distinguido dos enzimas diferentes, el piridoxal fosfato-dependiente y el piruvoyl-dependiente. Las bacterias Gram negativas poseen la encima HDC fosfato piridoxal dependiente, la misma que se produce en el cuerpo humano para generar histamina endógena; mientras que las bacterias Gram positivas poseen la HDC piruvoyl-dependiente (Landete *et al.*, 2008).

Es por ello que aquellos alimentos que tengan alto contenido en el aminoácido histidina en sus proteínas y sufran procesos de fermentación (quesos, embutidos, vino, cerveza etc.) o por sus características físico-químicas no evitan el crecimiento microbiano en su deterioro (pescado), son susceptibles a tener altas concentraciones de histamina (FAO/WHO, 2013).

Prueba de esto último es que tradicionalmente la intoxicación por histamina se ha asociado a pescados de la Familia *Scombridae* como caballa, atún, marlín, pez espada, atún blanco, bonito, barrilete y casi otras cien especies; aunque también pescados distintos a los escómbridos, como los de la Familia *Clupeidae* (sardinas y arenques) o el *Coryphaena hippurus* (mahi-mahi), pueden tener altas concentraciones de histamina. Estas especies coinciden en ser pescados de agua salada y grasos, es decir, que almacenan la grasa de forma intramuscular y no en las vísceras. La acción proteolítica de las catepsinas post mortem causa la degradación de la proteína de pescado y la liberación de aminoácidos, los cuales pueden ser atacados por el equipo enzimático de las bacterias capaces de realizar una descarboxilación de los mismos para formar los compuestos aminos no volátiles. Por esta razón la histamina, como otras aminos biógenas (putrescina, tiramina y esparmina) se considera un indicador de la calidad y la frescura del pescado. Sin embargo el pescado puede contener niveles elevados de histamina sin mostrar signos de deterioro (Huss, 1997; EFSA, 2011; EFSA, 2017).

Los microorganismos asociados a la formación de histamina se encuentran comúnmente sobre las branquias y vísceras del pez de forma natural. Al no ser microorganismos patógenos, los peces no han desarrollado mecanismos de defensa para inhibir su crecimiento, aumentando el número de bacterias que aprovechan la histidina libre presente en el medio en el proceso post-mortem (FAO/WHO, 2013).

Los principales microorganismos causantes de la transformación de histidina en histamina son bacterias Gram negativas de diferentes familias. Algunas de estas bacterias son de la familia *Enterobacteriaceae*, de los géneros *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, y *Escherichia*, sobre todo de la especie *E. coli*; así como algunas especies de los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Photobacterium*. Algunos microorganismos Gram positivos como *Clostridium* y *Lactobacillus* también son capaces de producir histamina. Sin embargo las bacterias productoras más potentes de histamina son las siguientes especies de enterobacterias: *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Hafnia alvei* (Huss, 1997; EFSA, 2011).

Sin embargo, las especies concretas de microorganismos que producen histamina en las diferentes especies de pescado, o las proporciones exactas en las que estas se encuentran son difíciles de predecir ya que dependen de múltiples factores como la ubicación geográfica, la alimentación de los peces, sus hábitos, la temporada de pesca, la temperatura y calidad del agua, los procesos de manejo así como la limpieza en el barco y en el punto de venta. Asimismo la cantidad de histamina que producen es proporcional a la eficacia de la enzima HDC, la cual depende de factores como la temperatura, el pH o la concentración de sal (Feng, Teuber, y Gershwin, 2016).

Los microorganismos productores de histamina son mesófilos en su mayoría y son capaces de crecer y producir histamina en un amplio rango de temperatura. Sin embargo, la formación de histamina es más rápida a temperaturas elevadas por encima de los 20 °C que a temperaturas cercanas a la refrigeración. A los 20 °C se tardan entre 2 y 3 horas en producir cantidades tóxicas de histamina. Sin embargo el crecimiento es particularmente rápido a temperaturas próximas a los 30 °C (FDA, 2011; Feng, Teuber, y Gershwin, 2016).

Las tres especies que más histamina producen (*Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Hafnia alvei*) no son capaces de multiplicarse a temperaturas por debajo de los 5 °C y alcanzan la máxima producción de histamina a temperaturas entre 25 y 30 °C (Lehane y Olley, 2000). No obstante algunas especies bacterianas logran producir histamina a temperaturas inferiores a 5 °C. Es el caso *Photobacterium spp*, un psicrótrofo capaz de proliferar en refrigeración y a concentraciones de sal elevadas (Van Spreekens, 1987).

La principal bacteria productora de histamina, *M. morganii*, se desarrolla mejor a pH neutro. No obstante, puede desarrollarse en un rango de pH entre 4,7 y 8,1. Este microorganismo no es muy resistente a la sal, tolera hasta un 5%. Por lo tanto, la producción de histamina por este microorganismo es un problema sobre todo en productos pesqueros poco salados (Huss, 1997).

Además la enzima HDC generada previamente por los microorganismos se mantiene activa a temperaturas de refrigeración incluso si las bacterias productoras ya no están activas (Salazar, 2016).

La histamina se considera una sustancia termorresistente, capaz de soportar tratamientos térmicos como la pasteurización y la esterilización, los cuales inactivaran a

las bacterias formadoras del enzima HDC y el propio enzima HDC, pero no a la histamina preformada en el alimento. También resiste al frío y tratamientos como la congelación y la refrigeración no reducirán la cantidad de histamina preformada (Fernández- Salguero y Mackie, 2004; Goulding, 2016).

5.1.2. Caracterización del peligro:

La intoxicación por histamina conocida comúnmente como síndrome escombroides o escombrotismo, fue descrita por primera vez en 1799 en Gran Bretaña y resurgió en la literatura médica en la década de 1950 cuando se empezaron a reportar diferentes brotes en Japón. En el caso de Estados Unidos, los primeros casos documentados datan de 1968. Desde entonces han sido descritos casos en múltiples instituciones como restaurantes, cafeterías, cuarteles del ejército, escuelas y hospitales (Feng, Teuber, y Gershwin, 2016).

Los síntomas más comunes de la intoxicación por histamina son similares a un cuadro alérgico: enrojecimiento facial o general, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, taquicardias, náuseas, vómitos, urticaria, boca seca, mareos, y raramente sibilancias o pérdida de la conciencia debido a la hipotensión. Otros estudios señalan también síntomas como secreciones nasales, edemas en los párpados y asma. Algunas personas presentan una intolerancia a la histamina y no son capaces de metabolizarla, por lo que el cuadro clínico se agrava dando lugar a calambres, espasmos bronquiales y trastornos respiratorios graves. La mayoría de los pacientes que han sufrido una intoxicación por histamina, experimenta solamente algunos de los síntomas ya señalados y su severidad depende de la dosis ingerida y de la susceptibilidad del individuo (Valls, 2002; EFSA, 2011; FAO/WHO, 2013; (Feng, Teuber, y Gershwin, 2016).

Estos síntomas suelen aparecer entre los 5 minutos y las 2 horas tras la ingestión. Los síntomas desaparecen normalmente a las 8-12 horas y no suelen persistir por más de 24 horas. Sin embargo, en algunas ocasiones pueden alargarse hasta varios días, pero no se conoce que causen secuelas a largo plazo ni se considera letal (FAO/WHO, 2013).

El cuerpo humano es capaz de metabolizar la histamina de forma natural mediante dos enzimas, la diamina oxidasa (DAO) y la histamina-N-metiltransferasa (HMT). La DAO transforma la histamina en ácido imidazolacético, mientras que la HMT transforma la histamina en metilhistamina la cual puede ser metabolizada en ácido acético-N-imidazol con ayuda de la enzima monoamina oxidasa (MAO). Los productos obtenidos de la metabolización de la histamina se excretan en la orina (FAO/WHO, 2013).

La DAO se genera principalmente en el tracto intestinal, y es liberada en el intestino para reducir considerablemente la cantidad de histamina exógena que podemos asimilar. La HMT se libera al torrente sanguíneo y es generada en multitud de tejidos de diferentes órganos como el pulmón, el intestino delgado y el estómago; pero principalmente se genera en el hígado, el colon y el bazo. Cabe destacar también que DAO es una enzima cuyo sustrato pueden ser otras aminas biógenas (como cadaverina y putrescina) mientras que HMT es específica para metabolizar histamina (FAO/WHO, 2013; Cebrián, 2018).

Otra vía de degradación de la histamina es a través de bacterias intestinales, las cuales son capaces de acetilar la histamina ingerida a través de la dieta (Rosell, 2015).

Sin embargo se ha demostrado que existe una población sensible a la histamina donde las rutas de metabolización de la misma no funcionan correctamente debido a factores genéticos o patológicos. Se cree que la intolerancia a la histamina por déficit de DAO ocurre en un 2-5% de la población. Pacientes con enfermedades gastrointestinales de tipo crónico como el síndrome de colon irritable, así como pacientes que sufren de migrañas, tumores o leucemia mielótica crónica tienen alterado el metabolismo para metabolizar la histamina (Cebrián, 2018; EFSA, 2011).

Asimismo, existen más de 60 fármacos capaces de inhibir la acción de las enzimas encargadas de la metabolización de la histamina, DAO y MAO: antidepresivos, medicamentos para tratar el Parkinson, antituberculosos, tratamientos mucolíticos, y algunos antibióticos entre otros (Zugasti, 2009; Cebrián, 2018).

Tampoco debemos olvidar que algunos alimentos con gran contenido en tiamina, cadaverina o tiramina también pueden inhibir la DAO ya que compiten con la histamina y pueden potenciar la toxicidad de la histamina. El alcohol y tabaco pueden incrementar la sensibilidad a las aminas biógenas ya que reducen la capacidad de metabolización de la misma (Zugasti, 2009; FAO/WHO, 2013; Cebrián, 2018).

Aunque la dosis tóxica y los síntomas de la intoxicación son variables, la enfermedad generalmente se asocia al consumo de productos de la pesca con concentraciones de histamina entre 500 y 1000 ppm (Huss, 1997; Stommel, 2015).

Para establecer el nivel sin efecto adverso observable NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) se consideraron dos estudios en los que se buscaba hallar la relación dosis-respuesta entre la concentración de histamina en la muestra y los síntomas de la intoxicación. Ambos estudios se realizaron con voluntarios sanos a las que se les

administraron dosis crecientes de histamina hasta que manifestaron alguno de los síntomas de la intoxicación, especialmente enrojecimiento facial y dolor de cabeza. A partir de una ingesta de 90 y 100 mg de histamina con una ración media de pescado (250 g), 2 de cada 8 voluntarios comenzaba a padecer alguno de estos síntomas. Se estableció entonces que el contenido máximo de histamina en el pescado debía ser de 50mg en una ración de 250g, o lo que es lo mismo, una concentración de 200 ppm, dando un margen de seguridad suficiente para no tener un efecto adverso en la salud del individuo (Motil y Scrimshaw, 1979; Van Gelderen *et al.*, 1992; Comisión del Codex Alimentarius, 2014).

Si bien el NOAEL se considera valor seguro en individuos sanos, este puede no ser el caso para aquellos individuos con una mayor sensibilidad. En estos casos, puede ser necesario considerar un nivel de peligro más bajo u otras opciones específicas de gestión de riesgos, tales como informar al consumidor sobre el peligro de la intoxicación histamínica asociada al consumo de pescado. Estos individuos con capacidad reducida de metabolizar histamina, mostrarán los síntomas de la intoxicación histamínica con dosis más bajas que una persona sana, sin embargo cualquier persona puede sufrir una intoxicación de este tipo ya que depende de la ingesta de dosis elevadas de histamina en corto tiempo hasta tal punto que el organismo no puede metabolizar (Comisión del Codex Alimentarius, 2013).

5.1.3. Evaluación de la exposición:

Se ha comprobado que el pescado es el alimento que con mayor frecuencia produce brotes de intoxicaciones por la histamina; a pesar de que este compuesto puede aparecer en otros tipos de alimentos como quesos, embutidos, cerveza, vino etc. Es por ello que para realizar la evaluación del riesgo vamos a centrarnos en este producto.

Estudiando las tasas de consumo del mismo podemos apreciar que a nivel mundial el consumo anual de pescado se estima que es cercano a 20 kg *per cápita*. Sin embargo es difícil predecir una cifra exacta ya que el consumo depende de factores culturales, geográficos y económicos (FAO, 2018).

A nivel nacional, se estima que el consumo de pescado anual es de 23,7 kg *per cápita*, por encima de la media mundial a pesar que su consumo ha disminuido un 8,1 % desde 2016 (25,5 kg *per cápita*) (Martín, 2017; MAPA, 2019). En cuanto al consumo anual *per cápita* de las especies propensas a tener cantidades elevadas de histamina, 0,97 kg se corresponden al consumo de boquerones frescos, 0,47 kg corresponden a bonito y atún

fresco, 0,44 kg se corresponden al consumo de sardinas frescas y 0,33 kg se corresponden a caballa fresca (MAPA, 2019). A este consumo debe añadirse el de conservas de pescado en España, siendo la conserva de atún la más consumida con 2,2 kg per cápita al año, seguida de las conservas de sardinas (0,25 kg per cápita al año), caballa (0,15 kg per cápita al año) y anchoas (0,09 kg per cápita al año) (MAPA, 2019).

En Aragón el consumo anual de pescado es de 26,4 kg per cápita, lo cual indica que estamos por encima de la media nacional. Comparando con otras comunidades autónomas, somos la quinta comunidad autónoma con la mayor tasa de consumo por debajo de Asturias, Castilla y León, Galicia y País Vasco (Martín, 2017).

Centrándonos en el consumo extradoméstico, un español promedio consume al año entre 40 y 46,6 kg de alimento fuera del hogar, incluyendo restaurantes, bares, cafeterías, pubs y discotecas, banquetes y ceremonias, comida para llevar, comedores escolares y universitarios y otros comedores; de los cuales cerca de 4 kg se corresponden a productos de la pesca. Es la tercera categoría de alimentos más consumida fuera del hogar, por detrás de la carne (5,6 kg per cápita) y las verduras y hortalizas (14,3 kg per cápita) (Martín, 2018 y MAPA, 2019).

Teniendo en cuenta las tasas de consumo, podemos hacernos una idea del nivel de exposición al que está sometida la población. Pero para realizar correctamente la evaluación de la exposición, debemos considerar las tasas de histamina en los distintos productos de la pesca de los últimos años.

En Carolina del Norte entre 1998 y 1999 se notificaron 5 brotes con 22 personas afectadas, de los cuales 9 fueron hospitalizados. En todos ellos el atún había estado implicado como vehículo de la histamina cuyos niveles oscilaban entre 213 y 3245 ppm. El origen de los 5 brotes fueron restaurantes, donde el atún había sido congelado y descongelado varias veces antes de ser servido, además 2 de los 5 restaurantes no cumplían con los límites de temperaturas de refrigeración (Becker *et al.*, 2001).

Entre 2004 y 2007, Austria, Francia, Hungría, Italia, Malta, Portugal, Rumania y Eslovenia informaron que entre un 0,7 % y un 16,7 % de sus muestras analizadas mediante los controles oficiales contenían más de 100 ppm de histamina. Hungría informó la mayor proporción de muestras positivas seguido de Malta. Todos estos países, informaron de muestras con niveles de histamina superiores a los 200 ppm, siendo Italia

la que encontró un menor número de muestras por encima de este nivel (0,3 %) frente Hungría, con un 33,3 % de las muestras analizadas con concentraciones superiores a los 200 ppm (Technical University of Denmark, 2012).

Un estudio realizado en restaurantes de la República Checa en el que se analizaron 112 muestras de pescado crudo de agua dulce y salada demostró que aproximadamente un 15% de las muestras mostraba niveles de aminas biógenas por encima de los 100 ppm. En dicho estudio se analizaron 8 aminas biógenas, histamina entre ellas, y 6 de las muestras dieron lecturas por encima del límite legal de histamina. La conclusión del estudio fue que era necesario mantener la cadena de frío en todo momento (congelación y refrigeración) durante la distribución de los productos hasta que el producto llega al consumidor (Buňka *et al.*, 2013).

Los resultados del control oficial en diferentes establecimientos de Austria entre 2010 y 2014 muestran que un 4,9 % del total de muestras de pescado analizadas (8.898 muestras) no eran aptas para el consumo humano. Entre las causas que las hacen no aptas para el consumo destacan la descomposición, la aparición de nematodos y la elevada concentración de histamina (Lueckl *et al.*, 2019).

En Taiwán se analizaron 32 muestras de pescado desecado en 5 mercados minoristas, demostrando que 25 de las muestras dieron lecturas por encima de 50 ppm, y 14 de ellas con más de 500 ppm, lo cual es una dosis alarmante para las autoridades sanitarias ya que puede comprometer la salud del individuo. En este estudio también se detectaron más de 30 cepas de microorganismos productores de histamina, lo cual viene a reforzar la idea de un buen mantenimiento de la cadena de frío ya que es muy difícil evitar la contaminación bacteriana (Lin *et al.*, 2012).

En otro estudio realizado en Taiwán entre septiembre de 2002 y marzo de 2003, se analizaron ciento cuatro muestras de pescado. Las muestras fueron pescado frito aliñado, 44 envasados y 60 sin envasar, obtenidos de diferentes los supermercados. Todos los productos envasados y 24 de los 60 no envasados mostraron cantidades de histamina detectables. Catorce muestras de productos envasados y dos muestras de productos no envasados tenían niveles de histamina considerables, los cuales estaban comprendidos entre 53 a 87 ppm y 75 a 108 ppm, respectivamente. La conclusión de este estudio es que los productos envasados son más propensos a desarrollar histamina, posiblemente por una

mala manipulación y contaminación de las bacterias productoras (Yeh, Lin, y Hwang, 2006).

Continuando con estudios realizados al sur de Taiwán, tras dos brotes producidos en dos restaurantes en mayo de 2004, los cuales causaron 59 y 43 intoxicaciones respectivamente, se analizó una muestra de pescado frito y cinco muestras de filete de pescado congelado de los restaurantes sospechosos respectivamente. Los análisis demostraron que el contenido en histamina de las muestras superaba los 1500 ppm (Tsai *et al.*, 2007).

Un estudio en La Habana como parte de la vigilancia sanitaria, entre el 2010 y 2014, tomó 128 muestras de pescado y productos pesqueros entre los que se incluye atún, bonito, jureles y sardinas entre otros. El 27,34 % de las muestras analizadas tuvo concentraciones de histamina por encima límite máximo permitido en Cuba de 100 ppm. El mayor porcentaje de estas coincidió con las que mayor manipulación tienen en el proceso productivo por lo que concluyen que se deben extremar las medidas higiénicas sanitarias durante la captura y el procesado de estos productos para evitar contaminación (Hernández y Suarez, 2015).

5.1.3.1 Análisis de histamina mediante enzimoimmunoensayo competitivo

La gastronomía Española va ligada al concepto de restauración, especialmente las “tapas”. Los primeros registros de tapas se relacionan con el jamón y los embutidos utilizados para tapar los “chatos” de vino y así este no perdiera su aroma. Obviando su origen, la tapa y la cultura del tapeo es un concepto moderno, de principios del siglo XX. Hay autores que se atreven a asegurar que podemos estar orgullosos de nuestra gastronomía y el tapeo ya que pronto se reconocerá como Patrimonio Inmaterial por la UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura) (Duhart, 2018).

Prueba de ello, es que España aún se considera el país del mundo con mayor densidad de bares por habitante (1 bar cada 175 habitantes). La estadística cambia en función de la fuente, pero se considera que actualmente puede haber cerca de 280.000 locales de restauración en nuestro país. Cada español realiza una media de 159 visitas al año a locales de restauración, y en cada visita cada español suele gastar cerca de 5 euros (MAPAL software, 2018).

Si nos centramos en el territorio Aragón, se estima que en 2013 existían más de 8400 bares y restaurantes (HERALDO, 2013), eso significa un bar por cada 160 habitantes de nuestra comunidad. En 2018 en Zaragoza, se encontraban en activo 5104 negocios de restauración (El Periódico de Aragón, 2018).

El Tubo es la zona turística por excelencia para los amantes de la gastronomía Zaragozana. En sus calles se mezclan los establecimientos más vanguardistas con sus tapas y raciones a la última moda, con las humildes tabernas y cervecerías más tradicionales. Es cierto que en Zaragoza destaca la gastronomía rural y sencilla, sin embargo una de las tapas más famosas en la ciudad de Zaragoza es el Guardia Civil, un mini bocadillo de sardina rancia sobre pepinillo y tomate o pimiento. También es común encontrar en los establecimientos boquerones en vinagre, anchoas en salmuera, atún en escabeche etc., y en los más atrevidos, sushi de atún en diferentes formatos. Todas estas “tapas”, se elaboran con ingredientes susceptibles de presentar elevadas cantidades de histamina.

De los 14 establecimientos visitados en 10 de ellos las “tapas” se mantenían visibles al público. Todos ellos mantenían algunas de sus “tapas” en refrigeración en campana protectora, pero sólo en 5 de ellos la campana de refrigeración contaba con un lector de temperatura visible al público.

En 4 establecimientos, las “tapas” se prepararon en cocina, por lo que se desconoce la temperatura o el estado en el que conservaba la muestra.

Todas las muestras se analizaron en el laboratorio siguiendo el procedimiento descrito en el punto 4.2.3, para la cuantificación del contenido en histamina. Los valores de absorbancia obtenidos en el análisis de las muestras se interpolaron con las curvas patrón correspondiente. Se realizaron dos curvas diferentes ya que los análisis se realizaron en días diferentes. Las curvas se pueden apreciar con detalle en el Anexo II.

Se interpolaron las medias de las absorbancias de las muestras reflejadas en el Lector Elisa dando lugar a las siguientes concentraciones de histamina. Con el objetivo de detectar patrones comunes y diferencias notables, se han agrupado los resultados de dos formas, por especie y por establecimientos:

Tabla 1: Concentración de histamina en las diferentes muestras en función de la especie de pescado de la que se trate y el tipo de tratamiento culinario recibido en relación con el límite legal establecido en el Reglamento (CE) nº 2073/2005.

| <i>Código de muestra</i> | <i>Tipo de muestra</i> | <i>Tratamiento culinario</i> | <i>concentración de histamina (ppm)</i> | <i>Límite legal establecido (ppm)</i> |
|--------------------------|------------------------|------------------------------|---|---------------------------------------|
| M1 | Atún | Escabechado | < L.D | M: 400 m: 200 |
| M2 | Atún | Escabechado | <L.D | M: 400 m: 200 |
| M3 | Atún | Escabechado | <L.D | M: 400 m: 200 |
| M4 | Atún | Escabechado | 0,54 | M: 400 m: 200 |
| M5 | Atún | Escabechado | 6,49 | M: 400 m: 200 |
| M6 | Atún | Crudo | <L.D | M: 200 M:100 |
| M7 | Atún | Crudo | 4,85 | M: 200 m:100 |
| M8 | Atún | Crudo | 0,78 | M: 200 m: 100 |
| M9 | Atún | Crudo | 0,99 | M: 200 m: 100 |
| M10 | Atún | Crudo | <L.D | M: 200 m:100 |
| M11 | Sardina | Marinado | 31,66 | M: 400 m: 200 |
| M12 | Sardina | Salmuera | <L.D | M: 400 m: 200 |
| M13 | Sardina | Salmuera | 4,19 | M: 400 m: 200 |
| M14 | Boquerón | Conservado en aceite | 4,04 | M: 400 m: 200 |
| M15 | Boquerón | Conservado en vinagre | <L.D | M: 400 m: 200 |
| M16 | Boquerón | Conservado en vinagre | 0,49 | M: 400 m: 200 |
| M17 | Anchoas | Salmuera | 0,52 | M: 400 m: 200 |
| M18 | Anchoas | Salmuera | 15,29 | M: 400 m: 200 |
| M19 | Anchoas | Salmuera | 2,86 | M: 400 m: 200 |
| M20 | Arenque | Salmuera | 4,01 | M: 400 m: 200 |
| M21 | Arenque | Conservado en aceite | 6,99 | M: 400 m: 200 |

L.D: 0,44 ppm

A la vista de los resultados obtenidos, podemos observar que el 33% de las muestras analizadas se encontraban por debajo del límite de detección establecido en el kit (0,44 ppm) por lo que lo que sólo podemos asegurar que la concentración de histamina en dichas muestras es inferior a 0,44 ppm. En el resto la concentración de histamina se encontraba entre 0,49 ppm y 31,66 ppm, pero ninguna superaba el límite legal establecido por la legislación vigente en la Unión Europea.

La concentración de histamina más alta se detectó en una sardina marinada servida en una tostada con tomate y cubierta de cebolla caramelizada y vinagre de Módena. La “tapa” se elaboró en cocina, por lo que desconocemos las condiciones de conservación de la misma. La muestra que presentó una concentración en histamina más baja corresponde a unos lomos de boquerón conservados en vinagre preparados en cocina.

El atún es de las especies más propensas a tener cantidades elevadas de histamina debido al gran contenido en el aminoácido histidina y al tamaño considerable de las piezas, lo cual hace difícil una refrigeración rápida y homogénea. No conocemos el estado en que las piezas de atún llegaron al establecimiento ni el origen de las materias primas, pero si evaluamos las muestras de atún, tanto en crudo como en escabeche, observamos que el 50 % de las muestras se encontraban por debajo del límite de detección y el valor cuantificable de histamina más alto fue de 6,49 ppm.

Las muestras de anchoa y arenque son las únicas donde todas muestran valores por encima del límite de detección. En el caso de la anchoa, los valores oscilan entre 0,52 ppm y 15,29 ppm. Este último se trata del segundo valor más alto de histamina de los que disponemos en el análisis.

La búsqueda de un patrón común analizando los resultados en función del tipo de producto o tratamiento culinario no ha resultado relevante.

Sería necesario aportar nuevos datos y estudios, al igual que ampliar el rango a restaurantes y cafetería establecidos por el Decreto 81/1999, de 8 de junio, del Gobierno de Aragón como Grupo II para tener una evaluación del riesgo más completa sobre este sector. Asimismo los resultados obtenidos deberían ser confirmados por el método oficial establecido por la legislación la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) con derivatización post-columna con O-Ftaldehído (Reglamento (CE) nº 2073/2005).

5.1.4. Caracterización del riesgo:

A pesar de que mis resultados muestran unas concentraciones por debajo del límite legal de histamina en lo referente al sector de la restauración en la localidad de Zaragoza, el escaso número de muestras y establecimientos visitados hace que sea insuficiente para asegurar una alta o baja exposición a este agente de peligro. Es por ello que para caracterizar el riesgo se ha llevado a cabo una recopilación de brotes por histamina en los últimos años. Estos muestran una tendencia creciente y podría ser más grave debido a que

existe un alto porcentaje de pacientes que no informa a su médico de atención primaria o urgencias debido a que los síntomas son de carácter leve y duración limitada. Por este motivo, y porque a menudo se confunde con una alergia alimentaria, muchos casos de intoxicación por histamina no se declaran, por lo que es probable que se trate de una enfermedad infradiagnosticada en los registros epidemiológicos (Valls, 2002; Guergué, Barrutia y Gardeazabal, 2016).

Japón, Estados Unidos (EE.UU) y Reino Unido son los países con el mayor número de casos reportados de histaminosis. Es probable que esto implique un mejor registro y comunicación de los casos por su parte (Goulding, 2016). En EE.UU se describieron 463 casos entre los años 1998 a 2002, mientras que, en Japón, entre los años 1998 y 2008, se describieron 89 brotes y 1577 casos, nunca con mortalidad (CDC, 2006; Toda, 2009). En la ciudad de Nueva York se reportan anualmente cerca de 70 casos de histaminosis en hospitales y salas de urgencia, aunque se sospecha que puede haber más (Stommel, 2015).

En lo referente a la Unión Europea (UE), entre 2010 y 2014 se registraron 306 brotes alimentarios a causa de la histamina por 12 estados miembros de la UE. Para 168 de los brotes, existía una gran evidencia del alimento que vehiculó el brote. Alrededor del 90 % de estos brotes surgieron a causa de pescado y productos de la pesca en mal estado. Durante ese periodo, hubo un total de 867 casos registrados, de los cuales sólo un 11% de los casos requirieron atención médica. En 2015, se registraron un total de 80 brotes alimentarios a causa de la histamina por 7 estados miembros de la UE, los cuales causaron un total de 437 casos con 43 hospitalizaciones. Sin embargo sólo en 23 existía una gran evidencia del alimento responsable de producir los brotes. Estos brotes con evidencia, produjeron en ese año un total de 193 casos y 11 hospitalizaciones. Al igual que en el periodo anterior, casi el 90% de los brotes con evidencia se debieron al pescado y productos de la pesca en mal estado. Cabe destacar que el atún en diferentes formatos fue responsable de 5 brotes. Además, de esos 23 brotes con evidencia del alimento que vehiculó la histamina, se sabe que 13 se originaron en restaurantes, cafeterías, bares y hoteles; mientras que sólo 3 se originaron por consumo en el hogar (EFSA, 2017).

Centrándonos en el territorio nacional, entre 2003 y 2006 se identificaron 47 brotes a causa de la histamina, de los cuales 17 se originaron en restaurantes y 5 en bares, mientras que 18 se originaron en el ámbito familiar (ISC, 2007). Mientras que entre 2008 y 2011 hay evidencia de 88 brotes alimentarios a causa de histamina con un total de 413 casos y 10 hospitalizaciones (ISC, 2014). En mayo de 2017 se produjo el brote más importante

por histamina descrito hasta la fecha en nuestro país, el cual afectó a más de 40 personas en varias comunidades de España, entre ellas Andalucía, Murcia y Madrid (ACSA, 2017).

Por último, si queremos relacionar nuestro estudio con los datos epidemiológicos de la comunidad autónoma de Aragón, entre 2012 y 2016 se declararon 11 brotes de histamina en los cuales 24 personas se vieron afectadas (DGSP, 2017). En 2017 surgieron 4 brotes por histamina, todos ellos en Huesca (DGSP, 2018). El brote más reciente ocurrió precisamente en un restaurante de la provincia de Teruel por consumo de atún a la plancha, el cual originó 5 personas afectadas. Este brote se produjo a finales de junio de 2019 y se considera una llamada de atención para todo el sector de la restauración (DGSP, 2019).

5.2. GESTIÓN DEL RIESGO:

La gestión de riesgos es el proceso mediante el cual se analizan y se sopesan las distintas opciones normativas a la luz de los resultados de la evaluación del riesgo previa y, si es necesario, la selección de las medidas apropiadas necesarias para prevenir, reducir o eliminar el riesgo y garantizar el alto nivel de protección de la salud que determina la UE.

Los encargados de la gestión, a la hora de adoptar decisiones, necesitan considerar una serie de informaciones, además de la evaluación científica del riesgo. Estas incluyen, por ejemplo, la posibilidad de controlar una situación de riesgo, las acciones más eficaces para reducirlo en función de la parte de la cadena de suministro de alimentos donde el problema se repite, las disposiciones prácticas necesarias, los efectos socio-económicos y el impacto ambiental (FAO, 2004).

La histamina es la única amina biógena con límites máximos establecidos en el Reglamento (CE) nº 2073/2005 y sus modificaciones posteriores, para productos de la pesca procedentes de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina (en el que se especifica pescados de las familias *Scombridae*, *Scombrosidae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae* y *Pomatomidae*). Para pescado crudo se lleva a cabo un muestreo específico (n= 9, c= 2, m= 100 y M= 200 ppm) diferente del que se lleva a cabo para 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 (en el que se especifican las mismas familias citadas anteriormente) y salsas de

pescado producida por fermentación de productos de la pesca ($n= 9$, $c= 2$, $m= 200$ y $M= 400$ ppm).

En el Reglamento (CE) nº 854/2004 y sus modificaciones posteriores, se indica que la autoridad competente efectuará pruebas aleatorias en los productos de la pesca para la detección de histamina, a fin de comprobar que se cumple con los niveles permitidos que establece la legislación vigente. El método analítico de referencia acreditado se basa en la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) con derivatización post-columna con O-Ftaldehído, el cual queda establecido en la norma EN ISO 19343. Esto se debe a que el HPLC permite cuantificar los niveles de histamina con una sensibilidad elevada, de forma fiable y científicamente reconocida (AESAN, 2017).

Se ha planteado como solución para la mejora de la gestión del riesgo una posible reducción del límite máximo de inocuidad usado en los controles oficiales. En 2014, algunos participantes de la Comisión del Codex Alimentarius propusieron bajar el límite máximo de $M = 200$ ppm a $M= 100$ ppm en las normas pertinentes sobre el pescado y los productos pesqueros (menos en la norma para la salsa de pescado), para lograr proporcionar un margen de inocuidad o incertidumbre respecto del NOAEL identificado para los sujetos sanos expuestos a la histamina. El límite de inocuidad propuesto no debería afectar a la industria, pues de acuerdo con los datos proporcionados por esta última, resulta fácil alcanzar concentraciones de histamina inferiores a 15 ppm (Comisión del Codex Alimentarius, 2014).

Sin embargo es cierto que las personas sanas que no presentan una incapacidad genética o un impedimento externo para metabolizar la histamina, manifiestan los síntomas de la intoxicación histamínica con concentraciones entre 500 y 1000 ppm (Huss, 1997; Stommel, 2015) muy superiores a los 200 y 400 ppm que establece actualmente la legislación. Por tanto se desconoce hasta qué punto es útil dar un margen de seguridad tan grande, si realmente el NOAEL establecido garantiza la seguridad de los consumidores.

Una reducción tal del límite vigente podría además perjudicar considerablemente a los restaurantes ya que los productos procedentes de zonas más cálidas pueden haber alcanzado valores por encima de 100 ppm antes de llegar incluso al restaurante, a pesar

de mantener perfectamente la cadena de frío una vez adquirido el producto (Comisión del Codex Alimentarius, 2014).

Los restaurantes y los establecimientos están obligados a la aplicación de un sistema de autocontrol basado en los principios del sistema APPCC donde se van a controlar aquellos peligros que por su severidad y su alta probabilidad de aparición deban ser controlados de una manera específica en una etapa especial, y el no cumplimiento de las condiciones que se especifican en el APPCC puede comprometer la inocuidad del producto (Reglamento (CE) n° 852/2004).

La histamina, como se ha dicho anteriormente, es una sustancia termorresistente, por lo que una vez formada no va a ser posible su eliminación o reducción de su concentración en el alimento. Por lo tanto es necesario aplicar estrategias que permitan prevenir su formación (Goulding, 2016). Para ello contaremos con la ayuda de los prerequisites de higiene que deben ser implantados antes del plan APPCC. En especial se debe hacer hincapié en la histamina en aquellos planes de higiene relacionados con evitar o reducir la contaminación y multiplicación de las bacterias productoras de histamina. Esto se puede lograr mediante varias vías, usando materias primas de calidad, asegurando una buena manipulación de las mismas al igual que una buena limpieza, asegurar la cadena de frío durante todo el proceso, y si es posible, realizar controles microbianos adicionales que aseguren que se está controlando el peligro de intoxicación histamínica (ELIKA, 2013).

La mejor forma de controlar la aparición de histamina es mediante el control de la temperatura durante todas las etapas de producción y especialmente durante el almacenamiento. La legislación exige el control de la cadena de frío en los productos pesqueros, especificando que los productos pesqueros frescos y los productos pesqueros no transformados descongelados deben conservarse a temperaturas cercanas a la fusión del hielo entre 0 y 4°C, por tanto debe quedar constancia de esos límites de temperatura en el plan de control de cadena de frío de nuestro establecimiento (Reglamento (CE) n° 853/2004).

El plan de control de materias primas y homologación de proveedores se debe exigir que el pescado venga en hielo, agua de mar refrigerada, hielo picado o salmuera, y que la refrigeración del mismo sea lo antes posible tras la captura. En el caso del atún grande (superior a los 10 kg) debe enfriarse a una temperatura interna inferior o igual a 10 °C

antes de las 6 horas posteriores a la muerte. Las medidas higiénicas del buque y la rapidez con el que el pez se refrigera son vitales para asegurar unos niveles bajos de histamina desde el principio ya que las etapas posteriores son dependientes de las buenas prácticas que se hayan llevado a cabo durante la captura (Goulding, 2016).

Los restaurantes deben asegurarse de que la cadena de frío no se haya perdido en ninguna de las etapas desde la pesca, así como debe haberse tratado de forma higiénica y cuidadosa, asegurando de esta manera que su pescado esté fresco y sea inocuo para los consumidores.

La congelación por debajo de los $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pesar de ser un método más caro, resulta un método eficaz para la conservación de pescado. De esta forma se evita el crecimiento de los microorganismos, psicrótrofos y mesófilos, además de impedir el funcionamiento de la enzima HDC preformada en el alimento. Es por ello que este método paraliza completamente la producción de histamina y es una manera eficaz de conservar el pescado. La congelación aporta una mayor vida útil al pescado y, si no altera las cualidades organolépticas al descongelarse, es una forma ideal de conservar pescado que vaya a servirse en crudo (FAO/WHO, 2013).

Una vez almacenado y asegurando el buen estado de nuestra materia prima procedemos a procesar el pescado en el interior del establecimiento. Nuestro plan de buenas prácticas de fabricación debe asegurar que la limpieza del pescado se realice en condiciones higiénicas y en el menor tiempo posible. Eliminando los órganos dónde se alojan estos microorganismos productores de histamina, piel, branquias e intestino se puede reducir la probabilidad de que estos alcancen el músculo y comiencen a producir histamina.

A la hora de cocinar el pescado tenemos que llegar a temperaturas de pasteurización o esterilización lo antes posible para evitar que el pescado permanezca mucho tiempo a temperaturas de entre 20 y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, ya que se favorece la multiplicación microbiana y puede aumentar la producción del enzima HDC y aumentar la concentración de histamina considerablemente. A pesar de que estos tratamientos no eliminen la histamina preformada, resultan eficaces para la destrucción de microorganismos y enzimas. *Morganella morganii* es considerada la bacteria productora más resistente, y se comienza a inactivar, tanto la bacteria como el enzima HDC, entre los 58 y $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una D de entre 15 y $1,5$ segundos. Tratamientos tiempo relativamente corto pueden aumentar el

tiempo de conservación de los productos, produciendo productos listos para el consumo (Osborne y Bremer, 2000).

Al igual que el tratamiento térmico, las altas presiones hidrostáticas y la irradiación serían medidas para eliminar las bacterias formadoras de histamina, sin embargo, los efectos sobre el enzima HDC han sido menos estudiados, y en algunos casos se ha demostrado que la irradiación aumenta la producción de histamina, tal vez como resultado de la modificación de la estructura del enzima HDC (Naila *et al.*, 2010).

Otros métodos para evitar el crecimiento microbiano y así evitar la producción de histamina en el pescado es mediante la modificación del pH (acidificándolo en vinagres o salmueras), la a_w (desechándolo), la concentración de sal (añadiendo sales) o conservándolo en atmósfera libre de CO₂ (al vacío o conservas en aceite). En muchos restaurantes se aprovechan de estas barreras para aumentar la vida útil de muchas de sus tapas, a la vez que confieren sabores y texturas que las hacen especiales y muy bien valoradas (anchoas en salmuera, boquerones en vinagre, atún en escabeche, sardinas en aceite etc.) (FAO/WHO, 2013).

Algunos aditivos tales como sorbato de potasio, nitritos de sodio, glucono-delta-lactona y la glicina también han demostrado inhibir el crecimiento de las bacterias productoras de histamina, por lo que podría añadirse al pescado para prevenir su formación. Varias especias como ajo, canela, clavo, cúrcuma, orégano, pimienta roja y negra etc. tienen efectos bactericidas y pueden ser aplicadas con efectos similares. Sin embargo, la efectividad de los aditivos y las especias ha sido poco estudiada y sus efectos sobre las características sensoriales, su aceptación del consumidor en tales productos ha hecho que no se consideren una medida eficaz (Cubillo, 2007; Naila *et al.*, 2010; FAO/WHO, 2013).

Si un establecimiento desea realizar de forma casera pescado fermentado, debe conocer perfectamente que una fermentación favorece el crecimiento microbiano, por lo que debe evitar el crecimiento de las especies que posean el enzima HDC. Para ello podemos utilizar cultivos iniciadores o starter que no posean dicha enzima y añadirlos junto a bacterias capaces de metabolizar las aminas biógenas como algunos tipos de bacterias ácido lácticas (Naila *et al.*, 2010; Álvarez y Moreno-Arribas, 2014).

El sector de la restauración, tal como indica el Reglamento (UE) n° 1169/2011, debe llevar el control de los alérgenos descritos en la normativa, desde la recepción y

almacenaje, hasta la producción, manipulación y servicio. El problema es que la histamina no está incluida en esa lista de 14 alérgenos y en ocasiones puede ser desconocida por parte de los manipuladores. Por ello es que, a nivel legislativo, podría ampliarse la lista de alérgenos para incluir la histamina como parte de ellos, unido a la ampliación de los programas de formación de los manipuladores. En el plan de formación establecido por el establecimiento debe quedar constancia de que el personal del restaurante sea conocedor de que es la histamina, cómo se produce, y cómo podemos controlarla. Deben saber qué especies son propensas a tener elevadas dosis de histamina y por ello se ha elaborado un listado completo de las especies propensas a producir elevadas cantidades de histamina y que pueden ser comercializadas en España. Este listado debido a su extensión se muestra en el Anexo II.

Como norma general, todo empleado del establecimiento debe ser conocedor de unas medidas básicas relacionadas con el almacenamiento de las materias primas para prevenir fácilmente la contaminación del pescado y la producción de histamina.

A pesar de saber que la histamina puede encontrarse en altas concentraciones sin que el pescado manifieste indicios de putrefacción, es cierto que está ligada a procesos de degradación y pérdida de frescura. Es por ello que los empleados de un restaurante deben saber identificar los signos de frescura del pescado y realizar análisis organolépticos que incluyan la valoración de la piel, olor, branquias, color y carne. Por tanto se recomienda que las piezas de pescado vengan enteras, para poder juzgar de una mejor manera el estado del pescado y que sean procesados en el restaurante garantizando unas más prácticas de manipulación e higiene (Generalitat de Catalunya, 2015).

Durante la conservación en refrigeración, ya sea del pescado entero, o pescado ya procesado; y para evitar la contaminación cruzada, se han establecido una serie de recomendaciones para los trabajadores a la hora de almacenar las materias primas y así lograr una disminución del riesgo de aparición de histamina en elevadas concentraciones. Estas recomendaciones son igual de válidas para ser aplicadas en el hogar (Baixauli y Gomis, 2003; Generalitat de Catalunya, 2015):

- Usar envases herméticos, papel film o una termoselladora para evitar que los productos queden abiertos y expuestos cuando se almacenan en refrigeración.
- Respetar el orden en las estanterías, los pescados a punto de consumir en la parte superior y los pescados que quedan por procesar en la inferior. De esta forma los

alimentos sin procesar con mayor carga microbiana no contaminarán aquellos listos para el consumo.

- Evitar el contacto directo del pescado con el suelo para evitar la contaminación.
- Tener una correcta rotación de existencias, colocando los pescados más frescos detrás para evitar que un producto permanezca excesivo tiempo en la cámara. A pesar de ello, lo ideal sería recibir y servir el pescado en el mismo día.
- Garantizar la trazabilidad de los productos elaborados y sin elaborar dentro del sistema de refrigeración. Esto es vital para poder realizar los seguimientos de las materias primas en caso de las autoridades de seguridad alimentaria lo requieran.
- Limpiar los equipos de refrigeración con atención y de forma periódica. Además no se deben introducir envases o embalajes sucios.
- Controlar la temperatura de las neveras y asegurarse que las puertas se encuentren herméticamente cerradas cuando no haya nadie en su interior.

5.3. COMUNICACIÓN DEL RIESGO:

La comunicación del Riesgo es el intercambio interactivo de información y de opiniones relacionadas con los peligros y los riesgos alimentarios entre las personas con responsabilidad en la evaluación y gestión del riesgo, los consumidores, las empresas alimentarias y de piensos, la comunidad científica y demás partes interesadas (FAO, 2004).

En lo referente al riesgo que nos concierne, histamina en restauración colectiva, el análisis concierne a los consumidores, propietarios y personal del sector, las autoridades nacionales e internacionales y los sistemas de intercambio rápido de información de seguridad alimentaria entre los que destacan el sistema RASFF y SCIRI. Los datos proporcionados por estos sistemas muestran el aumento de notificaciones por histamina.

Desde que se formó la red RASFF en 1979, la histamina ha estado presente en las diferentes notificaciones de la misma, incluyendo alertas, información para atención, información de seguimiento y rechazo en frontera. Entre 1979 y 2001 sólo hubo 42 notificaciones por histamina, sin embargo entre 2002 y 2010 se convirtieron en 315 notificaciones (Leuschner *et al.*, 2013).

Entre 2011 y 2015 se llegaron a sumar un total de 190 notificaciones. Asimismo, también se ha demostrado que los principales responsables de las notificaciones han sido

pescados como el atún y derivados, llegando a sumar un total de 307 notificaciones desde 2002 a 2015 (Leuschner *et al.*, 2013 y D.´Amino *et al.*, 2018).

Entre 2016 y 2019, las notificaciones de histamina han sido 121 según los datos recopilados en RASFF portal. En todas estas notificaciones han estado involucrados productos de la pesca, especialmente el atún, el cual ha sido responsable de 66 de las notificaciones y 7 alertas con afectados.

Entre 2014 y 2017, se registraron 97 notificaciones por el RASFF entre alertas, informaciones para atención y rechazos en frontera, donde el atún con elevadas concentraciones de histamina estaba implicado, alcanzando su máximo en 2017, cuando se registraron 27 notificaciones (EFSA, 2017).

El atún es responsable de la mayoría de brotes y alertas por histamina según los datos recopilados. Prueba de ello es que entre 2011 y 2015, el atún estuvo involucrado en un 55,7% de las notificaciones que superaban los límites máximos de histamina, mientras que solamente el 25,8% sardinas, y el 8,4% anchoas quedan como los siguientes grupos más representativos (Mercogliano y Santonicola, 2019).

Centrándonos en el territorio nacional, la Red SCIRI muestra de nuevo esta tendencia creciente ante las notificaciones de histamina, siendo de nuevo el atún responsable de la mayoría de las mismas. Entre 2007 y 2017 según los informes anuales se han detectado 79 alertas por histamina, 279 informaciones para atención y más de 90 rechazos en frontera debido a altos niveles de histamina (AESAN, 2019b).

En 2017 se detectaron 259 notificaciones de alertas, el nivel más elevado desde 2007 (293 alertas), de las cuales 25 estaban relacionadas con la histamina. A simple vista no parece un número elevado, pero si tenemos en cuenta que las notificaciones de alertas en productos de origen animal fueron de 151 y dentro de estas las alertas de origen biológico en animales fueron 75, las alertas por histamina suponen una tercera parte de las alertas de los peligros biológicos que aparecen en productos de origen animal.

De estas 25 alertas debido a histamina, 19 de ellas tuvieron afectados. Las alertas alimentarias con afectados en 2017 fueron 31, lo cual supone que la intoxicación por histamina ocupó un 61% de los casos con afectados.

SCIRI señala además que es el atún en diferentes formatos (congelado, descongelado y refrigerado o envasado al vacío) la causa de estas alertas alimentarias (22 alertas y 11

informaciones para atención corresponden a un alto contenido en histamina en atún de origen es español) (AESAN, 2017).

En conclusión, podemos ver que los sistemas de intercambio de información funcionan perfectamente, tanto a nivel nacional como internacional, aumentando la seguridad y la confianza de los consumidores.

A nivel de los consumidores, las autoridades nacionales en sus páginas web, tanto a nivel nacional (AECOSAN) como a nivel autonómico (ACSA, ELIKA etc.) ponen a disposición del consumidor toda la información necesaria acerca del peligro y cómo evitarlo. En sus sedes web se muestran los cuadros de información de los que disponen estas entidades y en los que se indican medidas preventivas y de control para este peligro a nivel doméstico.

6. CONCLUSIONES:

1. La histamina es un peligro alimentario ampliamente estudiado por la comunidad científica. Sin embargo, se constata que la información sobre el riesgo asociado al consumo de alimentos en restauración colectiva es muy limitada para obtener datos concluyentes que complementen la parte experimental de este trabajo.
2. La tendencia creciente de este riesgo y dadas las tasas de consumo de pescado y de alimentos fuera del hogar, unido a la vulnerabilidad del sector de la restauración ante brotes alimentarios, hace que sea necesario integrar medidas específicas para la prevención y el control de este peligro en el sistema de autocontrol de este sector alimentario.
3. Los resultados de la prospección analítica realizada en la ciudad de Zaragoza corroboran una gestión eficaz de la prevención y control del riesgo de histaminosis en restauración colectiva. Además, la Administración Pública controla dichos establecimientos velando por que se cumplan las condiciones de higiene que son determinantes para unos niveles óptimos de seguridad alimentaria.
4. Los sistemas de intercambio rápido de información constituyen una herramienta esencial para que los consumidores y el personal del sector de la restauración puedan acceder fácilmente a la información que concierne a una situación de riesgo de histamonosis. No obstante, es necesario intensificar mensajes preventivos insistiendo en consejos respecto a la temperatura y procesos de manipulación de alimentos.

CONCLUSIONS:

1. Histamine is a food hazard widely studied by the scientific community. However, it is found that the information on the risk associated with the consumption of food in catering mass is very limited to obtain conclusive data that complement the experimental part of this work.
2. The increasing trend of this risk and given the rates of consumption of fish and food outside home, together with the vulnerability of the catering sector to food outbreaks, makes it necessary to integrate specific measures for the prevention and control of this danger in the self-control system of this food sector.
3. The results of the analytical survey carried out in the city of Zaragoza confirm an effective management of the prevention and control of the risk of histaminosis in catering mass. In addition, the Public Administration controls these establishments, ensuring that the hygienic conditions, decisive for optimum levels of food safety are met.
4. Rapid information exchange systems are an essential tool so that consumers and staff in the catering sector can easily access information concerning a situation of risk of histamonosis. However, it is necessary to intensify preventive messages insisting on advice regarding temperature and food handling processes.

7. VALORACIÓN PERSONAL:

Para la realización de este estudio se ha necesitado profundizar ampliamente en diferentes bases de datos que nos proporcionan las autoridades de seguridad alimentaria nacionales e internacionales. Me ha parecido muy interesante y enriquecedor para mi formación, debido a que se aprende a recopilar, seleccionar y analizar información de diferentes bases de datos, muy útiles para el sector de la investigación. La mayor dificultad que he encontrado ha sido ordenar y extraer la información de interés para el desarrollo de mi TFG dado los numerosos artículos recopilados. Además, con este estudio he aumentado mi capacidad de trabajar de forma autónoma y constante, siendo consciente que soy el responsable del desarrollo de mi propio trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. ACSA. (2019). Presentación. Disponible en: <http://acsa.gencat.cat/es/agencia/presentacio/> [Consultado 02-07-2019]
2. ACSA (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria). (2017). *Mapa de peligros alimentarios. Peligro químico, aminas: Histamina*. Disponible en: <http://acsa.gencat.cat/ca/detall/article/Histamina> [Consultado 11-05-2019]
3. AESAN. (2019a). Sobre AECOSAN. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/agencia/seccion/sobre_aesan.htm [Consultado 02-07-2019]
4. AESAN. (2019b). Informes del Sistema Coordinado de Intercambio de Información (SCIRI) Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subseccion/SCIRI.htm [Consultado 15-12-2018]
5. AESAN. (2017). *Memoria del sistema coordinado de intercambio rápido de información (SCIRI) 2017*. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/alertas/sciri/MEMORIA_ALERTAS_SCIRI_2017.pdf [Consultado 15-12-2018]
6. Álvarez, M. A., y Moreno-Arribas, M. V. (2014). "The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution". *Trends in Food Science and Technology*, 39 (2), pp. 146–155. DOI:10.1016/j.tifs.2014.07.007
7. Baixauli, J. y Gomis, C. (2003). *Guía de Prácticas Correctas de Higiene, Sector hostelería*. Valencia: FEHVP.
8. Becker, K., Southwick, K., Reardon, J., Berg, R. y MacCormack, J.N. (2001). "Histamine poisoning associated with eating tuna burgers". *Journal of the American Medical Association*, 285 (10), pp. 1327-1330. DOI: 10.1001/jama.285.10.1327.
9. Biblioteca de la Universidad de Zaragoza. (2018). *Guía de herramientas y pautas para un buen TFG: Ciencia y Tecnología de los alimentos 2018-19*. Disponible en: <https://moodle2.unizar.es/add/course/view.php?id=26154> [Consultado 02-07-2019]
10. Biblioteca de la Universidad de Zaragoza (2019). Biblioteca de la Universidad de Zaragoza. Disponible en: <http://biblioteca.unizar.es/> [Consultado 02-07-2019]
11. Buňka, F., Budinský, P., Zimáková, B., Merhaut, M., Flasarová, R., Pachlová, V., Kubáň, V. y Buňková, L. (2013). "Biogenic amines occurrence in fish meat sampled from restaurants in region of Czech Republic". *Food Control*, 31 (1), pp. 49-52. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.09.044
12. 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.
13. CDC. (2006). Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks - United States, 1998 -2002. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5510a1.htm> [Consultado 26-07-2019]
14. Comisión del Codex Alimentarius. (2014). "Tema 10 del programa: Documento de trabajo referente a la Histamina". *Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del codex sobre pescado y productos pesquero*. Bergen, 17-21 febrero de 2014. Roma: FAO/OMS, pp. 1-12.
15. Comisión del Codex Alimentarius. (2013). "Discussion paper histamine" *Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on fish and fishery products*. Bali, 1-5 de Octubre de 2012. Roma: FAO/OMS, pp. 1-7.
16. Comisión Europea. (2019) RASFF portal. Disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1> [Consultado 11-07-2019]
17. 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 13-05-2019]
18. Cubillo, M.L. (2007). *Determinación de la actividad antimicrobiana de algunas especies naturales sobre microorganismos asociados a alimentos*. Trabajo de fin de Grado. Universidad de Cota Rica.
19. D´Amino, P., Nucera, D., Guardone, L., Mariotti, M., Nuvoloni, R. y Armani, A. (2018). "Seafood products notifications in the EU Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) database: Data analysis during the period 2011–201". *Food Control*. 93. pp. 241-250. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.07.011
20. 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. Boletín Oficial de Aragón, n. 84, de 05 de Junio de 1999
21. DGSP [Dirección General de Salud Pública. Gobierno de Aragón]. (2019). "Información epidemiológica relevante". *Boletín Epidemiológico Semanal de Aragón*. Semana 26/2019 (24/06/2019)

- al 30/06/2019). Disponible en: https://www.aragon.es/documents/20127/1650151/BEsA_201926.pdf/6bd58ec0-72df-61c2-795b-b46f5fdaeb3?t=1562234225145 [Consultado 26-07-2019]
22. DGSP. (2018). *Informe de brotes epidémicos. Aragón 2017*. Disponible en: https://www.aragon.es/documents/20127/674325/Informe_BrotesEpidemicos_Aragon_2017.pdf/8b5253e6-d66b-3113-60cd-05335c66aea4 [Consultado 26-07-2019]
 23. DGSP. (2017). "Intoxicación histamínica por consumo de escómbridos". *Boletín Epidemiológico Semanal de Aragón*. Semana 18/ 2017 (01/05/2017 al 07/05/2017). Disponible en: https://www.aragon.es/documents/20127/674325/BOLETIN_ARAGON_201718.pdf/cb36b00c-5354-6ff9-c96e-fecdc4823b83 [Consultado 26-07-2019]
 24. Duhart, F. (2018). "Breve historia de un monumento gastronómico español", *Revista Española de Cultura Gastronómica*, 0: La tapa, 2018, pp. 37-52. Disponible en: https://www.academia.edu/37019909/_Breve_historia_de_un_monumento_gastron%C3%B3mico_espa%C3%B1ol_Revista_Espa%C3%B1ola_de_Cultura_Gastron%C3%B3mica_0_La_tapa_2018_pp._37-52 [Consultado 28-07-2019]
 25. EFSA. (2019). *Acerca de la EFSA*. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa> [Consultado 02-07-2019]
 26. 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
 27. 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
 28. El Sevier. (2019). El Servier. Disponible en: <https://www.elsevier.com> [Consultado 02-07-2019]
 29. ELIKA. (2018). Misión/ Visión/ Valores. Disponible en: <https://www.elika.eu/conocenos/misionvisionvalores/> [Consultado 02-07-2019]
 30. ELIKA. (2013). Histamina. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eu/wp-content/uploads/2018/01/13.Histamina-act.pdf> [Consultado 13-03-2019]
 31. El Periódico de Aragón. (2018). *Zaragoza registra 485 restaurantes y bares nuevos o traspasos este año*. Disponible en: https://www.elperiodicodearagon.com/noticias/temadia/zaragoza-registra-485-restaurantes-bares-nuevos-traspasos-ano_1332431.html [Consultado 01-08-2019]
 32. FAO. (2019). *Acerca de*. Disponible en: <http://www.fao.org/about/es/> [Consultado 02-07-2019]
 33. 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 24-07-2019]
 34. FAO. (2004). "Explicación de los juicios de valor y otros factores que influyen en el proceso de análisis de riesgos a nivel nacional e internacional". *Consulta de Expertos de la FAO sobre la Inocuidad de los Alimentos: Ciencia y Ética*. Roma, 3-5 septiembre de 2002. Roma: FAO, pp. 18-34. Disponible en: <http://www.fao.org/3/j0776s/j0776s00.htm#Contents> [Consultado 05-03-2019]
 35. 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.
 36. FDA. (2011). *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*. (4ª ed.). Florida: Ifas Extension Bookstore.
 37. Feng, C., Teuber, S. y Gershwin, M. (2016). "Histamine (Scombroid) Fish Poisoning: a Comprehensive Review". *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 50(1), pp. 64-69. DOI: 10.1007/s12016-015-8467-x.
 38. Fernández-Salguero, J. y Mackie, I.M. (1987). "Technical note: preliminary survey of the content of histamine and other higher amines in some samples of Spanish canned fish" *International Journal of Food Science and Technology*. 22, pp. 409-412. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1987.tb00504.x
 39. Generalitat de Catalunya. (2015). *Guía de prácticas correctas de higiene para restaurantes*. Barcelona: Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria.
 40. Goulding, I.C. (2016). "Guía relativa a los peligros para la seguridad de los alimentos in los productos de la pesca del Caribe" *CRFM Publicación Especial*, 11 (4), pp.10-16. Disponible en: <http://repositorio.iica.int/bitstream/11324/4191/2/BVE17089205e.pdf> [Consultado 25-05-2019]
 41. Guergué, O., Barrutia, A., y Gardeazabal, J. (2016). "Escombroidosis: abordaje práctico" *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 107 (7), pp. 567-571. DOI:10.1016/j.ad.2016.02.010
 42. HERALDO. (2013). Aragón tiene un restaurante o bar por cada 160 habitantes. Disponible en: <https://www.heraldo.es/noticias/aragon/zaragoza/2013/02/26/aragon-tiene-un-restaurante-o-bar-por-cada-160-habitantes-203027.html> [Consultado 01/08/ 2019]
 43. Hernández, I., y Suarez, S., (2015). "Contenido de histamina en pescados y productos pesqueros. Efectos de lavigilancia en el período 2010-2014" *La Industria Cárnica latinoamericana*, 192. Pp. 58-61.

- Disponible en: http://www.publitech.com.ar/contenido/objetosContenidodehistamina_ enpescados.pdf [Consultado 22/08/2019]
44. Huss, H.H. (1997). *Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. FAO Documento técnico de pesca. N° 334*. Roma: FAO. Disponible en URL: <http://www.fao.org/3/t1768s/T1768S00.htm> [Consultado 01-07-2019]
 45. ISC. (Instituto Carlos III). (2014). “Brotos de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2008-2011 (excluye brotes hídricos)”. *Boletín Epidemiológico Semanal*. 22 (11), pp. 130-145. Disponible en: <http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/889/1069> [Consultado 22-08-2019]
 46. ISC. (2007). “Brotos de intoxicación alimentaria por biotoxinas marinas debidos al consumo de pescado y marisco en España. 2003-2006”. *Boletín Epidemiológico Semanal*. 15 (12), pp. 133-136. Disponible en: http://revista.isciii.es/public/journals/1/pdf_93.pdf [Consultado 22-08-2019]
 47. 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
 48. Lehane, L. y Olley, J. (2000). “Histamine fish poisoning revisited” *International Journal of Food Microbiology*, 58 (1-2), pp. 1-37. DOI: 10.1016/s0168-1605(00)00296-8
 49. Leuschner, R. G. K., Hristova, A., Robinson, T. y Hugas, M. (2013). “The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) database in support of risk analysis of biogenic amines in food”. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29 (1), pp. 37-42. DOI:10.1016/j.jfca.2012.09.004
 50. Lin, C., Liu, F., Lee, Y., Hwang, C. y Tsai, Y.H. (2012). "Histamine contents of salted seafood products in Taiwan and isolation of halotolerant histamine-forming bacteria". *Food Chemistry*, 131(2), pp. 574-579 DOI: 10.1016/j.foodchem.2011. 09.027.
 51. Lueckl, J., Weyermair, K., Matt, M., Manner, K. y Fuchs, K. (2019). “Results of official food control in Austria 2010–2016”. *Food Control*. 99 (May 2019), pp. 190-201. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.12.016
 52. 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 24-07-2019]
 53. MAPAL software (2018) *Estadísticas sobre el sector de la restauración en España*. Disponible en: <https://mapalsoftware.com/estadisticas-sobre-sector-de-la-restauracion-espana/> [Consultado 30-07-2019]
 54. Martín, V.J. (2018). “El sector de la restauración en España”. *Distribución y consumo*, 4 (1), pp. 5-17. Disponible en: https://www.mercasa.es/media/publicaciones/251/Mercasa_distribucion_y_consumo_154_100_px.pdf [Consultado 28-07-2019]
 55. Martín, V.J. (2017). “Consumo de pescados y mariscos en España”. *Distribución y consumo*, 4 (2), pp. 5-18. Disponible: https://www.mercasa.es/media/publicaciones/236/1509981781_Consumo_de_pescados_y_mariscos.pdf [Consultado 28-07-2019]
 56. 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
 57. Motil, K.J. y Scrimshaw, N.S., (1979). “The role of exogenous histamine in scombroid poisoning. Toxicol”. *Lett*. 3, pp. 219-223. DOI: 10.1016/0378-4274(79)90037-7
 58. Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P. y Meerdink, G. (2010). “Control of biogenic amines in food - existing and emerging approaches”. *J. Food Sci.*, 75 (7), pp. 139–150. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x.
 59. Nelson, D.L. y Cox, M.M. (1987). *Lehninger: Principios de Bioquímica*. (5ª ed.) Sabadell: Ediciones Omega.
 60. Osborne, C.M. y Bremer, P.J. (2000). “Application of the bigelow (z-value) model and histamine detection to determine the time and temperature required to eliminate *Morganella morganii* from seafood”. *J. Food Prot.* 63(2), pp. 277–280. DOI: 10.4315/0362-028x-63.2.277
 61. 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
 62. Reglamento (CE) n° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 139, de 30 de abril de 2004.
 63. Reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea, L 139, de 30 de abril de 2004.

64. 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.
65. Reglamento (CE) nº 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. Diario Oficial de la Unión Europea, L139, de 30 de abril de 2004.
66. Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) nº 1924/2006 y (CE) nº 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) no 608/2004 de la Comisión. Diario Oficial de la Unión Europea, L304, de 22 de noviembre de 2011.
67. 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.
68. 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.
69. Salazar, G.Y. (2016). *Estudio de la formación de histamina en caballa (Scomberjaponicus), jurel (Trachurusmurphy) y anchoveta (Engraulisringens) en relación al tiempo y temperatura de almacenamiento*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de San Agustín
70. Stommel, E.W. (2015). "Scombroid Fish Poisoning". En: Simjee, S. *Infectious Disease: Foodborne Diseases*. Totowa: Humana Press Inc. pp. 375-381.
71. Technical University of Denmark. (2012). "Microbiological contaminants in food in the European Union in 2004-2009". *Supporting Publications*. 249, pp. 259. DOI: 10.2903/sp.efsa.2012.EN-249
72. Toda, M. Yamamoto, M. Uneyama, C. y Morikawa, K. (2009). "Histamine food poisonings in Japan and other countries". *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, 127, pp. 31-38. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20306704> [Consultado 29-08-2019]
73. Tsai, Y.H., Hsieh, H.S., Chen, H.C., Cheng, S.H., Chai, T. y Hwang, D.F. (2007). *Histamine level and species identification meats implicated in two food borne poisonings*. Taiwan, Australia: Asia University.
74. Valls, J. (2002). "Histamina en Atún y Otros Grandes Pelágicos. Métodos para su Cuantificación" *Aprovechamiento e industrialización de atún y otros grandes pelágicos*. Cumaná, 29-31 de mayo de 2002. Caracas: Universidad Central de Venezuela, pp. 1-10. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/307633908_Histamina_en_atun_y_otros_grandes_pelagicos_Metodos_para_su_cuantificacion [Consultado 23-04-2019]
75. Van Gelderen, C.E.M., Savelkoul, T.J.F., van Ginkel, L.A. y van Dokkum, W. (1992). "The effects of histamine administered in fish samples to healthy volunteers". *Clin. Toxicol.* 30, pp. 585-596. DOI: 10.3109/15563659209017944
76. Van Spreekens, K.J.A. (1987). "Histamine production by the psychrophilic flora". In *Seafood Quality determinatios*. Amsterdam: El Sevier, pp. 309-318. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302055498> [Consultado 25-4-2019]
77. Yeh, C., Lin, S. y Hwang, D. (2006). "Biogenic amines, histamine and label of dressed fried fish meat products in Taiwan". *Food Control*, 17(6), pp. 423-428 DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.02.002.
78. Zugasti, A. (2009). "Intolerancia alimentaria". *Endocrinología y Nutrición*, 56 (5), pp. 241-250 DOI: 10.1016/S1575-0922(09)71407

9. ANEXOS

Anexo I:

Tabla a: Búsqueda inicial realizada en Alcorze para distintas palabras clave indicando la fecha de búsqueda, número de artículos encontrados, número de artículos que se han considerado de interés para el trabajo, campo de búsqueda utilizado y periodo de búsqueda.

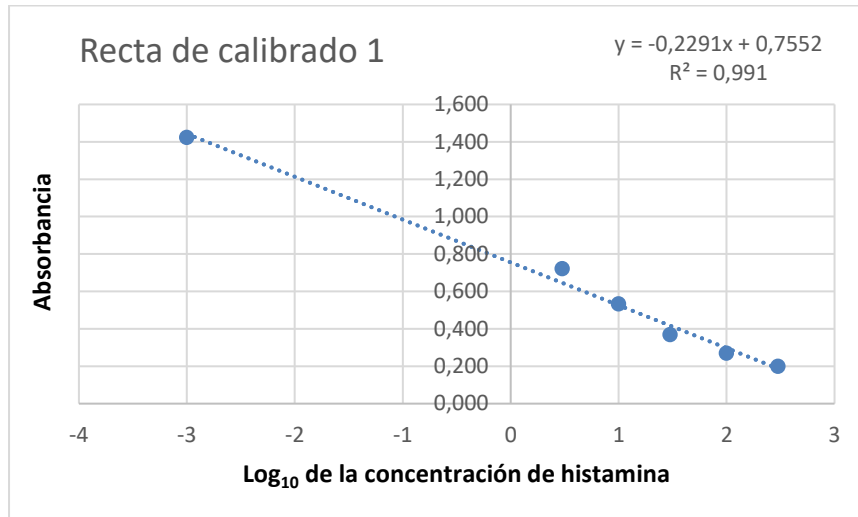
| Palabras clave | Fecha de búsqueda | Nº de documentos | Nº de artículos de interés | Campo de búsqueda | Periodo de búsqueda |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|----------------------------|--|---------------------|
| “Histamine” | 03/07/2019 | 7945 | 0 | “Título” | 2000-2019 |
| “Histamine” and “restaurants” | 03/07/2019 | 4 | 2 | “Título” and “texto completo” | 2000-2019 |
| “Histamine” and “Tuna” | 03/07/2019 | 68 | 3 | “Título” and “Título” | 2000-2019 |
| “Histamine” and “tuna” and “catering” | 03/07/2019 | 2 | 1 | “Título” and “texto completo” and “texto completo” | 2000-2019 |
| “histamine” and outbreak” | 03/07/2019 | 6 | 2 | “Título” and “texto completo” | 2000-2019 |

Tabla b: Búsqueda inicial realizada en Science Direct para distintas palabras clave indicando la fecha de búsqueda, número de artículos encontrados, número de artículos que se han considerado de interés para el trabajo, campo de búsqueda utilizado y periodo de búsqueda.

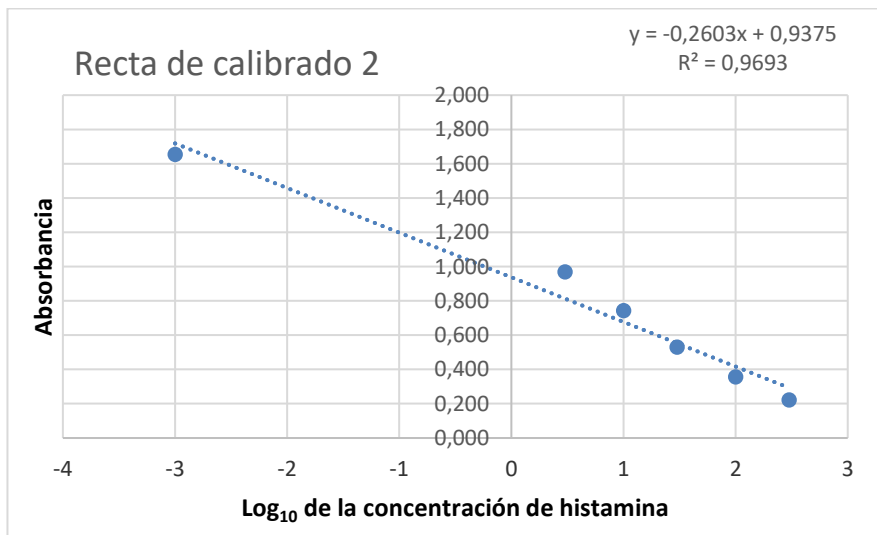
| Palabras clave | Fecha de búsqueda | Nº de documentos | Nº de artículos de interés | Campo de búsqueda | Periodo de búsqueda |
|----------------------------------|-------------------|------------------|----------------------------|--|---------------------|
| “Histamine” | 03/07/2019 | 60958 | 0 | “Find articles in these terms” | 2000-2019 |
| “Histamine” “tuna” | 03/07/2019 | 902 | 5 | “Find articles in these terms” | 2000-2019 |
| “Histamine” “tuna” “Spain” | 03/07/2019 | 251 | 1 | “ Find articles in these terms” | 2000-2019 |
| “Histamine” “Tuna” “Spain” | 03/07/2019 | 20 | 1 | “ Find articles in these terms” and “Food control” and “Encyclopedia of food Safety” | 2000-2019 |
| “histamina” “brote” | 16/07/2019 | 151 | 2 | Find articles in these terms” and “Food control” and “Encyclopedia of food Safety” | 2000-2019 |
| “histamine content” “restaurant” | 22/08/2019 | 16 | 3 | “Title” and “Find articles in these therns” | 2000-2019 |

Anexo II: Rectas de calibración utilizadas en el análisis experimental.

Recta de calibrado 1 siendo el eje Y la absorbancia detectada y el eje X el logaritmo decimal de las concentraciones del kit (0, 3, 10, 30, 100 y 300 ppm)



Recta de calibrado 2 siendo el eje Y la absorbancia detectada y el eje X el logaritmo decimal de las concentraciones del kit (0, 3, 10, 30, 100 y 300 ppm)



Anexo III: Listado de peces que representan un riesgo razonable de tener una cantidad elevada de histamina y pueden ser comercializados en España con el nombre comercial correspondiente. (FDA, 2011; Resolución de 26 de enero de 2018).

| Nombre comercial | Nombre en latín |
|--|-----------------------------------|
| Peto | <i>Acanthocybium solandri</i> |
| Atún lacón | <i>Allothunnus fallai</i> |
| Alosa/ Sábalo | <i>Alosa spp.</i> |
| Anchovetas | <i>Anchoviella spp.</i> |
| Melva | <i>Auxis spp.</i> |
| Sábalo | <i>Brevoortia spp.</i> |
| Bocona | <i>Cetengraulis mysticetus</i> |
| Dorado/ Lampuga | <i>Coryphaena spp.</i> |
| Anchoas/Boquerones/Bocartes | <i>Engraulis spp.</i> |
| Bacoreta | <i>Euthynnus spp.</i> |
| Pez vela | <i>Istiophorus platypterus</i> |
| Listado/Bonito de vientre rayado | <i>Katsuwonus pelamis</i> |
| Escolar negro | <i>Lepidocybium flavobrunneum</i> |
| Aguja negra | <i>Makaira spp.</i> |
| Sardineta | <i>Opisthonema 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> |
| Medregal | <i>Seriola rivoliana</i> |
| Espadín | <i>Sprattus spp.</i> |
| Anchovetas indias | <i>Stolephorus spp.</i> |
| Aguja /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> |