

CONTROL DE BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA EN LINEA DE ATÚN PRECOCIDO CONGELADO

Marcos Antonio Zambrano Alcivar^{1;2}, Lenin Dennys Zambrano Velázquez¹, Ely Fernando Sacón Vera¹, Dariel Intriago Bermúdez^{1;3}

¹ Programa de Maestría en Agroindustria, Escuela Superior Politécnica de Manabí Manuel Félix-López. Sitio “El Limón” Calceta, Manabí, Ecuador.

² Marbelize S.A., km 5.5 vía Manta-Rocafuerte, Jaramijo, Manabí, Ecuador.

³ La Fabril S. A., km 5.5 vía Manta-Montecristi, Montecristi, Manabí, Ecuador.

markos19835@gmail.com

RESUMEN

La intoxicación por escombrotóxina es producida por la ingestión de la histamina; es la intoxicación más común por consumo de pescado que no ha cumplido un debido control sanitario, los factores que influyen en la producción de histamina son: disponibilidad de histidina libre, presencia de bacterias que producen histidina descarboxilasa y condiciones favorables para el crecimiento. Una amplia gama de bacterias gran negativas aisladas en peces pueden producir histamina. Pueden producirse riesgos microbiológicos cuando los alimentos entran en contacto con superficies contaminadas o agentes infecciosos disperso por las corrientes de aire en el entorno de fabricación. Un programa de vigilancia ambiental se utiliza para evaluar la efectividad de los controles de los programas de prerrequisitos y puntos críticos de control del sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC). Para elaborar el programa de vigilancia se cumplirán las actividades de acuerdo a la norma mundial de seguridad alimentaria de la asociación de minoristas británicos (BRC, 2018) y para cumplir las actividades se aplicará los criterios de acuerdo a la comisión internacional de especificaciones microbiológicas para alimentos (ICMSF, 2018), Norma de la organización internacional de estandarización (ISO, 2018) número 185933, agar modificado de Niven, y cálculo de intervalos de tolerancia. El objetivo de este estudio es implementar un programa de vigilancia ambiental para el control de bacterias formadoras de histamina en la línea de atún precocido congelado en la empresa Marbelize S.A.

Palabras claves: Histamina, bacterias, programa de vigilancia ambiental, atún, límites de control.

ABSTRACT

Escombrotóxin poisoning is caused by ingestion of histamine; It is the most common poisoning due to fish consumption that has not fulfilled due sanitary control. The factors that influence histamine production are: availability of free histidine, presence of bacteria that produce histidine decarboxylase and favorable conditions for growth. A wide range of

gram-negative bacteria isolated in fish can produce histamine. Microbiological risks can occur when food comes into contact with contaminated surfaces or infectious agents dispersed by air currents in the manufacturing environment. An environmental monitoring program is used to evaluate the effectiveness of the controls of the prerequisite programs and critical control points of the hazard analysis system and critical control points (HACCP). In order to develop the surveillance program, the activities will be fulfilled according to the global food safety standard of the British retailers association (BRC, 2018) and to fulfill the activities the criteria will be applied according to the international commission of microbiological specifications for food (ICMSF, 2018), International Standardization Organization Standard (ISO, 2018) number 185933, modified Niven agar, and calculation of tolerance intervals. The objective of this study is to implement an environmental monitoring program for the control of histamine-forming bacteria in the frozen pre-cooked tuna line at Marbelize S.A.

Keywords: Histamine, bacteria, environmental monitoring program, tuna, control limits.

INTRODUCCIÓN

La intoxicación por escombrotóxina o intoxicación por histamina es producida por la ingestión de la histamina; es la enfermedad de transmisión alimentaria más común, por consumo de pescado que no ha cumplido un debido control sanitario. La formación de histamina, está relacionado a pescados que tienen de forma natural altos niveles de histina libre como los escombroides (caballa, atún, bonito), o no escombroides, como el pez espada (Pinillos, Gómez, Elizalde y Dueñas, 2003). En efecto la intoxicación por histamina puede llegar a ser fatal si no se trata a tiempo, siendo peor para los adultos mayores; las manifestaciones

clínicas de la intoxicación por histamina son principalmente neurológicas y cutáneas ejerciendo acción sobre el aparato cardiovascular, glándulas endocrinas y músculo liso (Field-Cortazares y Calderón-Campos, 2008).

Cabe recalcar que Mossalami y Agizy, indicaron que los factores que afectan la producción de histamina son la disponibilidad de histidina libre, la presencia de microorganismos que producen histidina descarboxilasa y las condiciones favorables para el crecimiento de dichos microorganismos (como se citó en Emmanuelle, Yolande, Rose y Henri, 2012). De modo similar Fathi, Pooladgar y Maghami (2013)

indican que las condiciones ambientales tales como la temperatura, la tasa de contaminación, la infestación bacteriana de peces, entre otras, influyen en la producción de histamina.

Middlebrooks, Toom, Douglas, Harrison y McDowell aislaron 14 bacterias que tuvieron actividad descarboxilasa, estas bacterias fueron: *Acinetobacter lwoffii*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter* spp, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus* spp, *Pseudomonas fluorescens/putida*, *Pseudomonas putregaciens*, *Pseudomonas* spp y *Vibrio alginolyticus* (como se citó en Gingerich, Lorca, Flick, McNair y Pierson, 2001).

La guía de orientación de controles y peligros de los productos pesqueros y piscícolas (Food and Drug Administration [FDA], 2011) establece que los pescados que forman histamina y que han sido tratados con calor suficiente para destruir las bacterias que forman histamina, tienen un alto riesgo de un desarrollo posterior de histamina, debido a que tienen la oportunidad de volverse a contaminar por bacterias del entorno.

De acuerdo con Jackson (2014), el programa de vigilancia ambiental se utiliza como una verificación de la efectividad de las medidas de control para evitar la entrada, el refugio y la multiplicación de patógenos microbianos en el entorno de producción, específicamente en la:

- Efectividad de los procedimientos de limpieza y saneamiento.
- Efectividad de los controles ambientales:
 - a. Controles asociados con la zonificación higiénica.
 - b. Movimiento de personas, equipos y materiales.
 - c. Actividades de construcción y mantenimiento.
- Identificación de áreas de ingreso o refugio para que puedan eliminarse.
- Investigación del impacto de los hallazgos adversos.

La Norma BRC (2018) en su octava edición, aumentó los requisitos del programa de vigilancia ambiental debido a la importancia que está tomando esta técnica. Las empresas necesitan

desarrollar y mantener un programa de vigilancia ambiental, prerrequisito crucial bajo la cobertura de un programa de análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) (Zacharski, Southern, Ryan y Adley, 2018).

Según la norma BRC (2018) el programa de vigilancia ambiental, mínimo debe de tener:

- Un protocolo de muestreo.
- Los puntos donde se tomarán las muestras.
- Las frecuencias de los análisis.
- Los organismos, por ejemplo agentes patógenos, organismos de descomposición u organismos indicadores.
- Los métodos de análisis.
- El registro y la evaluación de los resultados.
- Límites de control apropiados para el programa de vigilancia ambiental. La empresa deberá documentar las medidas correctivas que deban adoptarse cuando los resultados de la

vigilancia indiquen que no se ha cumplido un límite de control o que existe una tendencia al alza de positivos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

La presente investigación se realizara en la línea de atún precocido y congelado de la empresa Marbelize S.A., ubicado en el km 5.5 vía Manta-Rocafuerte, cantón Montecristi, provincia de Manabí-Ecuador.

Unidad experimental

Como unidades experimentales se analizara las etapas del proceso de la línea de atún precocido congelado.

Método para determinar el plan de vigilancia ambiental.

Se debe de definir un protocolo de muestro el cual se basara según la norma UNE-EN ISO 18593: 2018 para el caso de superficies y para el caso de ambientes se tomara con equipo MAS 100 (Merck), que viene configurado con un caudal de aspiración de 100 L/min y una velocidad de impacto inferior a 10,8 m/s. El volumen de aire muestreado será de 1000 litros

Los puntos donde se tomarán las muestras serán basados según el criterio de la (International Commission on Microbiological Specifications for Foods[ICMSF] 2018)

Las frecuencias de los análisis será de forma semanal de acuerdo a referencias de (ICMSF, 2018)

Se realizara la preparación de medio de cultivo para bacterias formadoras de histamina modificando el medio propuesto por Niven, Jeffrey y Corlett (1981). La modificación consiste en aumentar la concentración de agar para evitar la hidrólisis del agar en el proceso de esterilización, esta propuesta fue hecha por Mavromatis y Quantick (2002) y reemplazar el aminoácido L-histidina 2HCl por L-histidina HCl H₂O, esta modificación fue realizada por Guillén, Ponce, Fárres y Guerrero (2004). Esta última modificación se considera en esta investigación debido a que se realizó las consultas a empresas que venden reactivos marca Merck y Sigma Aldrich e indicaron que discontinuaron la producción de L-histidina 2HCl. Aplicando las dos modificaciones indicadas anteriormente la composición del medio de cultivo queda de la siguiente

forma: triptona 0,5%, extracto de levadura 0,5%, L-histidina HCl H₂O 2%, cloruro de sodio (NaCl) 0,5%, carbonato de calcio (CaCO₃) 0,1% , agar 3% y purpura de bromocresol 0,02%.

Para preparar el medio de cultivo se disuelven todos los ingredientes de acuerdo a la cantidad de agar que se requiera preparar, una vez diluido realizar ajuste del pH a 5,3 este ajuste se lo realiza con hidróxido de sodio uno molar si el pH es más ácido o si el pH es superior a 5,3 ajustar con ácido clorhídrico uno molar. Una vez el agar esté preparado colocar en autoclave a 121°C por quince minutos. Mantener el agar en baño maria a 45°C para que no se solidifique.

Para el caso de las superficies las diluciones decimales se preparan y se coloca 1 ml en una caja Petri, se agrega 10 ml del agar propuesto por Niven et al. (1981) modificado y se deja solidificar el agar, cuando ya esté solidificado se adiciona 5 ml del mismo medio para suprimir las colonias en expansión, posterior se deja solidificar el agar y se pone en incubación a 35°C por 48 Horas. Las colonias de las bacterias formadoras de histamina presentan un halo de color

purpura, contaje por cada caja petri, debe de realizarse en máximo de 80 colonias por dilución para evitar contar falsos positivos. Para el caso de método de siembra de muestras de aire, se colocara dentro del equipo Mas 100 una placa petri de 90 mm de diámetro que contiene un aproxima de 15ml de agar de modificado propuesto Niven et al. (1981) que previamente debe de estar estéril y en estado sólido. Una vez se tome la muestra se llevará al laboratorio de microbiología y se procede a la incubación, el contaje de resultados se realizara en unidades formadoras de colonias (UFC) en 1000 litros de aire, es decir UFC/ m³.

El registro y la evaluación de los resultados se realizaran en software microsoft excel 2013.

Para el cálculo de los límites de control, también denominado índices de tolerancia se aplicara la técnica indicada por Corpas (2009); Iguarán, Carmona, Betancur y Gonzáles (2011); Iguarán (2012), para el cual se realiza el siguiente procedimiento:

Realizar 10 análisis microbiológicos de superficies vivas e inertes y de aire, según el plan de muestreo. Los resultados será reportados y analizados utilizando

software microsoft excel 2013. Los pasos a seguir son:

- Organizar los datos en un cuadro, de manera que se convierta en la matriz que alimente el procesamiento estadístico de los datos.
- Establecer las medidas de tendencia central y dispersión: promedio y desviación estándar, las cuales son indispensables para establecer los límites de alerta y acción.
- Eliminar los datos atípicos, se consideraron atípicos, aquellos que cumplen con la siguiente condición:

$$(X - \text{med}(x_j)) / (\text{MEDA}(x_j)) > 4,5$$

Donde:

X, es la media muestral.

med(x_j), es la mediana de las observaciones.

MEDA(x_j), es la mediana de las desviaciones absolutas con respecto a la mediana.

- Establecer con ayuda de las medidas de tendencia central y dispersión, los límites de alerta y acción para los puntos de muestreo, mediante la fórmula:

$X \pm ks$, donde:

X = Media muestral.

k = Constante que tiene en cuenta el número de muestra y el nivel de confiabilidad.

s = Desviación estándar.

Para hallar la constante k , se utiliza los valores de la tabla estadística de factores de tolerancia para distribuciones normales, teniendo en cuenta el número de muestras y el nivel de confianza el cuál será al 95% para el límite de alerta y al 99% para el límite de acción.

Organizar los datos de límites de alerta y acción en una tabla, de manera que constituya el soporte guía de la empresa para la interpretación de los resultados microbiológicos a futuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BRC (British Retail Consortium) 2018. Global Standard. Food Safety. Issue 8. Recuperado de: <https://www.brcgsbookshop.com/bookshop/food-safety/c-24/c-70>

Corpas, E. (2009). Procedimiento para el establecimiento de intervalos de tolerancia a partir del análisis microbiológico de ambientes, superficies y manos de operarios en empresas del sector agroalimentario. Revista de Investigaciones - Universidad Católica de Manizales, 13(1), 157-163.

Emmanuelle, S. A., Yolande, A. A., Rose, K.-N. & Henri, B. (2012). Histamine Contents in Tuna Loins (*Thunnus spp.*) Produced in Côte d'Ivoire and its Relation with Bacterial Load. 3(6), 6.

Fathi, A. Z., Pooladgar, A. R., & Maghami, S. G. (2013). The Changes Evaluation of Biogenic Amines (Histamine) by HPLC, in Shanak Yellow Fin Fish (*Acanthopagrus latus*) Within 18 Days of Ice Storage. 6.

FDA (Food and Drug Administration). 2011. Fish and fishery products hazards

and controls guidance, 4th ed. April, 2011. United State of America.

Field-Cortazares, J., & Calderón-Campos, R. (2008). Escombroidosis, Intoxicación por Histamina. Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora, 25(2), 91-94.

Gingerich, T. M., Lorca, T., Flick, G. J., McNair, H. M., & Pierson, M. D. (2001). Isolation of Histamine-Producing Bacteria from Fish-Processing Facilities and Fishing Vessels. Journal of Aquatic Food Product Technology, 10(3), 61-66

Guillén, V. S., Ponce, A. E., Farrés, G. A. & Guerrero, L. I. (2004). Histamine production by two Enterobacteriaceae strains isolated from tuna (*Thunnus thynnus*) and jack mackerel (*Trachurus murphyi*). International Journal of Food Properties, 7(1), 91-103

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 2018. Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety management (2nd edition). New York, NY: Springer Science Business Media.

Iguarán, E. C., Carmona, P. H., Betancur, S. V. & Gonzáles, V. C. (2011). Detección de contaminación y

establecimiento de intervalos de tolerancia en una planta productora de arepa. Scientia et technica, 3(49), 286-291.

Iguarán, E. J. C. (2012). Establecimiento de un sistema para el monitoreo y control de la contaminación cruzada en el laboratorio de análisis microbiológico de alimentos durante 2009. Revista Ciencias de la Salud, 10, 53-67

ISO (International Organization for Standardization). 2018. Norma Española UNE-EN ISO 18593 Microbiología de la cadena alimentaria Métodos horizontales para toma de muestras de superficies. España.

Jackson, T. (2014). Management of Microbiological Hazards. En Food Safety Management (pp. 889-917). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381504-0.00033-0>

Mavromatis, P. & Quantick, P. C. (2002). Modification of Niven's medium for the enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use. Journal of food protection, 65(3), 546-551.

Niven, C. F., Jeffrey, M. B. & Corlett, D. A. (1981). Differential plating medium

for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(1), 321-322

Pinillos, M. A., Gómez, J., Elizalde, J. & Dueñas, A. 2003. Intoxicación por alimentos, plantas y setas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26. Ragasa, C.

Zacharski, K. A., Southern, M., Ryan, A. & Adley, C. C. (2018). Evaluation of an Environmental Monitoring Program for the Microbial Safety of Air and Surfaces in a Dairy Plant Environment. *Journal of Food Protection*, 81(7), 1108-1116. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-464>