

revista del
Comité
Científico de la aesan

Nº 14

agencia española de seguridad alimentaria y nutrición
agencia española de seguridad alimentaria y nutrición
agencia española de seguridad alimentaria y nutrición
agencia española de seguridad alimentaria y nutrición
agencia española de seguridad alimentaria y nutrición



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE SANIDAD POLÍTICA SOCIAL
E IGUALDAD



Agencia
Española de
Seguridad
Alimentaria y
Nutrición

Revista del Comité Científico de la AESAN

Madrid, 2011

revista del
Comité
Científico de la asesam

Nº 14

Nota del Comité Editorial

Los Informes que se incluyen a continuación son el resultado de las consultas que la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y otras instituciones hacen al Comité Científico. Esta revista y sus informes se presentan conforme a normas de presentación y

publicación de bibliografía científica internacionalmente aceptadas. De ello se deriva, entre otras, la necesidad de abordar su estudio e interpretación desde la consideración ineludible de las citas bibliográficas referenciadas en el texto y enumeradas en el apartado "Referen-

cias" que se incluye al final de los Informes. Lo contrario, además de dificultar su comprensión integral, pudiera llevar a extraer conclusiones parciales o equivocadas, divergentes del informe en su conjunto.

Revista del Comité Científico de la AESAN

Consejo Editorial

Presidenta de Honor

Leire Pajín Iraola

Editores Jefe

Roberto Sabrido Bermúdez

Ana María Troncoso González

Secretario del Comité Científico y editor

Vicente Calderón Pascual

Coeditores

Milagros Nieto Martínez

Rosa Sanchidrián Fernández

Octavio Rivera Atienza

Consejo Editorial Científico

Presidenta del Comité Científico

Rosaura Farré Rovira

Vicepresidente del Comité Científico

Francisco Martín Bermudo

Ana María Cameán Fernández

Alberto Cepeda Sáez

Mariano Domingo Álvarez

Antonio Herrera Marteache

Félix Lorente Toledano

M^a Rosario Martín de Santos

Emilio Martínez de Victoria Muñoz

M^a Rosa Martínez Larrañaga

Antonio Martínez López

Cristina Nerín de la Puerta

Teresa Ortega Hernández-Agero

Perfecto Paseiro Losada

Catalina Picó Segura

Rosa María Pintó Solé

Antonio Pla Martínez

Daniel Ramón Vidal

Jordi Salas-Salvadó

M^a Carmen Vidal Carou

Coordinadores de la edición

Ricardo López Rodríguez

Marta Pérez González

Responsable de Comunicación de la AESAN

Juan Julián García Gómez

AESAN: Alcalá, 56. 28071. Madrid

Diseño y maquetación

Montserrat Gómez

NIPO: 863-11-002-0

ISSN: 1885-6586

D.L.: M-27353-2005

Correo electrónico: uccaesan@mspsi.es

Imprime

Artegraf



Índice

Prólogo	7
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el botulismo infantil	9
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al efecto sobre la población española de la derogación de la normativa nacional sobre límites máximos permitidos para las aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂ en alimentos	27
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para <i>Listeria monocytogenes</i> en determinados productos alimenticios	43
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a la evaluación del riesgo de la exposición de lactantes y niños de corta edad a nitratos por consumo de acelgas en España	65
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre contaminación vírica de los alimentos, con especial énfasis en moluscos bivalvos, y métodos de control	89
Colaboraciones	
Evaluación del riesgo del consumo de derivados cárnicos frescos por determinados grupos de población en relación con la modificación del Real Decreto 1376/2003, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor	107
Cooperación científica con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)	133

Este número de la Revista del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición incluye cinco informes elaborados por miembros del Comité y que han sido discutidos y aprobados en la sesión correspondiente. Se tratan temas de interés para la seguridad alimentaria tales como: la legislación relativa a aflatoxinas, el botulismo infantil, *Listeria* y vida útil de los alimentos, nitratos en acelgas y virus entéricos. Se comentan a continuación algunos aspectos de interés.

El Reglamento (CE) N° 1881/2006 establece los contenidos máximos para la aflatoxina B₁ y la suma de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en los alimentos más frecuentemente contaminados por toxinas, que pueden constituir un riesgo para la salud humana. Y por otra parte, en España el Real Decreto 475/1988 establece contenidos máximos permitidos de aflatoxina B₁ y de la suma de las mencionadas aflatoxinas en alimentos para consumo humano, en general. Se plantea la cuestión de la conveniencia o no de derogar el mencionado Real Decreto por el efecto que ello podría tener sobre la población española. Tras revisar la información disponible se concluye que a falta de información representativa sobre la presencia de aflatoxinas en determinados alimentos, como por ejemplo la chufa, que el Reglamento no incluye, no parece oportuna la derogación del Real Decreto 475/1988, ya que protege al consumidor frente a alimentos no regulados por el Reglamento de la Comunidad Europea.

La gravedad del botulismo infantil y la existencia de algunos casos en España, si bien la incidencia es baja, son las causas por las que la Dirección Ejecutiva de la AESAN solicitó al Comité Científico la elaboración de un informe, que permita valorar el grado de conocimiento sobre el tema y su relación con el consumo de alimentos. De la revisión realizada, exhaustiva y actualizada, se desprende que: el botulismo infantil se produce por la ingesta de esporas de *Clostridium botulinum* durante el primer año de vida, período en que debido a la inmadurez de la flora intestinal, las esporas pueden pasar a formas vegetativas que liberan neurotoxinas al llegar al intestino grueso. No es fácil identificar el alimento vehículo de las esporas y cuando se consigue se trata de miel, en la mayoría de los casos, aunque también se han mencionado especies vegetales utilizadas en infusión. Al ser el procesado insuficiente para eliminar las esporas, se desaconseja su uso durante el primer año de vida. El cumplimiento de esta recomendación reduce el riesgo de forma significativa. Un aspecto de interés a destacar es la importancia de incluir en las encuestas epidemiológicas las condiciones ambientales que rodean al niño, debido a la amplia distribución de las esporas en el suelo.

En alimentos listos para el consumo, que pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, el Reglamento (CE) N° 2073/2005 establece ausencia del mencionado microorganismo en 25 g o un límite de 100 ufc/g en alimentos listos para el consumo, no destinados a lactantes o a usos médicos especiales, siempre que el fabricante pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que no se superará dicho límite durante toda la vida útil del producto. El informe elaborado proporciona pautas para ayudar al fabricante en la elección de la mejor manera de determinar la vida útil de los

alimentos que produce, y a las autoridades competentes para comprobar, cuando sea pertinente, que el fabricante del producto cumple con el requisito de no superar el límite de 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes* durante la vida útil del producto.

Recientemente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha publicado la evaluación de los posibles efectos en niños de los nitratos presentes en algunas verduras de hoja (espinacas y lechuga). En las conclusiones se señala la ausencia de riesgo de los contenidos de nitratos en lechugas y el riesgo de metahemoglobinemia en niños de 1 a 3 años para consumos de espinacas que excedan la ración diaria. Sin embargo, la evaluación no incluye las acelgas que también pueden ser ricas en nitratos, ni se dispone de normativa alguna relativa a contenidos máximos de nitratos en acelgas. Tras evaluar la información disponible sobre los contenidos de nitratos en acelgas, el Comité considera adecuado establecer valores máximos, al igual que se ha hecho en las espinacas, al tiempo que aconseja ampliar a las acelgas las recomendaciones de consumo de espinacas.

Los Norovirus humanos, causantes de gastroenteritis, y el virus de la hepatitis A, que origina hepatitis aguda, son los principales virus asociados a enfermedades de transmisión alimentaria. Los virus entéricos constituyen un riesgo para la salud del consumidor al mostrar una elevada estabilidad ambiental, hallarse en alimentos que suelen consumirse crudos o poco cocinados y que además pueden contaminarse por una elaboración inadecuada por manipuladores, sintomáticos o asintomáticos, excretores de virus. Los alimentos con mayor probabilidad de hallarse contaminados por dichos virus son: los moluscos bivalvos (por su elevada capacidad de filtración y de concentración de virus potencialmente presentes en las aguas), las verduras que se consumen crudas en ensalada y las bayas irrigadas por aguas con aportes fecales. Al ser España un importante país productor y consumidor de moluscos bivalvos se solicitó al Comité Científico la elaboración de un informe que valorase el estado de conocimiento en relación a la contaminación vírica de los alimentos y sus métodos de control, con especial atención a los moluscos bivalvos. El informe elaborado por expertos es muy completo, y en él se pone de manifiesto: el bajo porcentaje de infecciones por virus entéricos asociados al consumo de alimentos contaminados; y que los alimentos más a menudo asociados a gastroenteritis y hepatitis son los contaminados en origen y en menor medida lo que se contaminan por manipulación incorrecta durante su preparación. Por otra parte, la no multiplicación *in vitro* en cultivos celulares de los virus mencionados, hace que para su detección en matrices alimentarias se requiera el uso de técnicas moleculares (RT-PCR), que han sido desarrolladas y validadas por el Comité Europeo de estandarización (CEN/TC 275/WG6/TAG4-*viruses in foods*). Si bien las técnicas moleculares de cuantificación no proporcionan información sobre el potencial infeccioso de las muestras analizadas, se dispone de datos que permiten confirmarlo. Para disminuir al máximo el riesgo para la población, teniendo en cuenta que el riesgo cero no existe, es necesario definir los límites máximos de copias genómicas permisibles presentes en las muestras de alimentos.

Espero que los comentarios anteriores animen a leer, estudiar, valorar y utilizar los informes realizados, por su interés y actualidad en el campo de la seguridad alimentaria.

Rosaura Farré Rovira
Presidenta del Comité Científico de la AESAN

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el botulismo infantil

Miembros del Comité Científico

Rosaura Farré Rovira, Francisco Martín Bermudo, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Mariano Domingo Álvarez, Antonio Herrera Marteache, Félix Lorente Toledano, M^a Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, M^a Rosa Martínez Larrañaga, Antonio Martínez López, Cristina Nerín de la Puerta, Teresa Ortega Hernández-Agero, Perfecto Paseiro Losada, Catalina Picó Segura, Rosa María Pintó Solé, Antonio Pla Martínez, Daniel Ramón Vidal, Jordi Salas-Salvadó, M^a Carmen Vidal Carou.

Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2011-001

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de mayo de 2011

Grupo de Trabajo

M^a Rosario Martín de Santos (Coordinadora)
Antonio Herrera Marteache
Félix Lorente Toledano
Antonio Martínez López
Teresa Ortega Hernández-Agero
Cristina Alonso Andicoberry (AESAN)

9

revista del comité científico nº 14

Resumen

El botulismo infantil es una enfermedad que se presenta en niños de entre 1 y 52 semanas de edad, cuando ingieren esporas de *Clostridium botulinum*. Las esporas, en el intestino grueso, pasan a formas vegetativas y liberan neurotoxinas que actúan a nivel de la unión neuromuscular impidiendo la liberación del neurotransmisor acetilcolina. La gravedad de la enfermedad resultante varía desde una leve hipotonía a parálisis flácida sistémica, habiéndose llegado incluso a considerar causa de muerte súbita en lactantes. Las esporas de *C. botulinum* se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo y en los sedimentos acuáticos de todo el mundo. De los posibles alimentos que se han tratado de vincular con el botulismo infantil (miel, jarabe de maíz, preparados deshidratados para lactantes, cereales, infusiones de especies vegetales, etc.), la miel es el que con mayor frecuencia aparece como responsable en los casos en los que se logra identificar la fuente. No obstante, en la mayoría de las ocasiones no es posible esclarecer el origen de las esporas responsables de la enfermedad.

Muchos investigadores han señalado la importancia de las condiciones ambientales que rodean al niño y que facilitan su exposición a las esporas de *C. botulinum*, citándose como factores de riesgo el contacto con polvo o tierra en domicilios ubicados en zonas rurales donde se llevan a cabo actividades agrícolas y ganaderas, así como en áreas urbanas con abundantes zonas en construcción que implican movimientos de tierra, o cuando se realizan obras de rehabilitación en los inmuebles.

Se considera que la mínima dosis infectiva de esporas de *C. botulinum* está comprendida entre 10 y 100 esporas. Los datos epidemiológicos actuales permiten considerar que el riesgo de padecer la enfermedad es bajo en los niños menores de 12 meses si se evita el consumo de miel y/o infusiones de especies vegetales.

Palabras clave

Botulismo infantil, toxinas botulínicas, miel, infusiones de especies vegetales, polvo.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on infant botulism.

Abstract

Infant botulism is a disease that occurs in infants between 1 and 52 weeks years of age when spores of *Clostridium botulinum* are ingested. These spores germinate and produce neurotoxins in the large intestine lumen. These toxins act at the neuromuscular junction blocking release of acetylcholine neurotransmitter. Clinical severity varies from a mild hipotony to systemic flaccid paralysis. It has even been considered as the cause of infant sudden death. *C. botulinum* spores are commonly found in soil samples and aquatic sediments throughout the world. Honey is the most well-documented food source of *C. botulinum* spores for infants although corn syrup, infant formulas, dry cereals, plants infusions and dust have been also associated with infant botulism. However, for the majority of cases the source of the causative spores remains unclear.

Researchers have also stressed the importance of the child's natural environment that may facilitate the exposure to *C. botulinum* spores. Contact with dust or soil in houses from rural areas, where farming activities are carried out, has also been cited as a risk factor. As well as urban areas with big areas under construction involving earthmoving or restoration works in buildings.

It is considered that the minimum infective dose of spores of *C. botulinum* may be as low as 10-100 spores. Current epidemiological data indicate that the risk of disease is low in infants less than 1 year old by avoiding the consumption of honey and/or plants infusions.

Key words

Infant botulism, botulinum neurotoxin, honey, plants infusions, dust.

Introducción

Debido a la gravedad del botulismo infantil y a pesar de su baja incidencia, la existencia de casos en España ha determinado que la Dirección Ejecutiva de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) haya solicitado al Comité Científico la elaboración de un informe que valore el estado del conocimiento respecto al botulismo infantil y su relación con el consumo de alimentos.

Se denomina botulismo a una enfermedad neurológica grave que afecta al hombre y a los animales, caracterizada por una parálisis flácida y producida por neurotoxinas (Hatheway, 1990) (Midura, 1996). En la actualidad, se reconocen cuatro tipos de botulismo: intoxicación botulínica clásica, botulismo de las heridas, botulismo infantil y botulismo por inhalación.

La intoxicación botulínica clásica se produce por la ingestión de alimentos que contienen neurotoxinas sintetizadas por *C. botulinum* al multiplicarse en los alimentos. En 1821, Justinus Kerner estudió una serie de intoxicaciones alimentarias que atribuyó al consumo de salchichas mal elaboradas, denominando a la enfermedad botulismo, del latín *botulus* (salchicha). Kerner llegó a extraer un compuesto tóxico de las salchichas que identificó como el responsable de la enfermedad. En 1897, el microbiólogo belga Emile-Pierre van Ermengen aisló una bacteria esporulada, Gram positiva y anaerobia en un jamón responsable de una intoxicación alimentaria, a la que denominó *Bacillus botulinus* (*C. botulinum* en la actualidad).

En 1951, se describió el botulismo de las heridas que se desencadena cuando éstas se infectan con esporas de *C. botulinum*, que pasan a formas vegetativas y producen las neurotoxinas. Se han detectado casos en drogodependientes por inyección intravenosa (Kuusi et al., 1999) (Barry et al., 2009).

El botulismo infantil no se reconoció hasta 1976 (Midura y Arnon, 1976) (Pickett et al., 1976). Se presenta en niños de entre 1 y 52 semanas de edad, que ingieren esporas de *C. botulinum*. Las esporas, en el intestino grueso, pasan a formas vegetativas y liberan neurotoxinas que actúan a nivel de la unión neuromuscular impidiendo la liberación del neurotransmisor acetilcolina. La gravedad de la enfermedad resultante varía desde una leve hipotonía de pares craneales seguida de parálisis flácida descendente, simétrica, aguda, afebril a parálisis flácida sistémica, habiéndose llegado incluso a considerar causa de muerte súbita en lactantes. La variada sintomatología y su presentación inespecífica determina que sea una enfermedad difícil de diagnosticar y que pueda confundirse con otros procesos, principalmente con el síndrome de *Guillain-Barré* y la *Miastenia gravis* (Arnon, 2004). El botulismo infantil se ha detectado en muchos países, aunque los niveles de notificación han sido muy variables. La ausencia de casos suele atribuirse más a dificultades en el diagnóstico y sistema de notificaciones que a la inexistencia de la enfermedad. También se ha descrito en adultos una forma de botulismo similar al infantil, que se presentaría vinculada a infecciones gastrointestinales, tratamientos prolongados con antibióticos y cirugía intestinal (Chia et al., 1986) (Freedman et al., 1986) (Griffin et al., 1997).

El botulismo por inhalación de las neurotoxinas iría asociado a acciones bioterroristas. Se considera que un gramo de toxina purificada podría provocar la muerte por inhalación a más de un millón de personas, aunque pueden existir dificultades técnicas para su diseminación (Arnon et al., 2001).

Identificación del peligro

En 1976, el botulismo infantil se reconoce por primera vez como una forma clínica de botulismo diferente de la intoxicación botulínica clásica (Midura y Arnon, 1976) (Pickett et al., 1976). No obstante,

existe constancia de un caso documentado aunque mal diagnosticado ocurrido en 1931 en California (Arnon et al., 1979).

A diferencia de la intoxicación botulínica clásica que se desencadena por la ingestión de neurotoxinas presentes en el alimento, el botulismo infantil puede considerarse como un evento oportunista en el que esporas de *C. botulinum* penetran en el intestino grueso donde la inmadurez de la flora intestinal permite que las esporas germinen, pasen a formas vegetativas y liberen las neurotoxinas. Asimismo, cepas de *Clostridium butyricum* y de *Clostridium baratii* han sido también responsables de algunos casos de botulismo infantil por toxinas E y F (McCroskey et al., 1991) (Gimenez et al., 1992) (Fenicia et al., 2002) (Arnon, 2004) (Barash et al., 2005) (Brook, 2007) (Abe et al., 2008).

Desde 1976 se han notificado más de 2.900 casos a nivel mundial y hoy se considera la forma más frecuente de botulismo en muchos países (Koepke et al., 2008) (Barash et al., 2010) (Lúquez et al., 2010).

Caracterización del peligro

1. Características del agente y su patogenia

C. botulinum es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto y esporulado. Las esporas de *C. botulinum* están ampliamente distribuidas en el suelo y en los sedimentos acuáticos, pudiendo contaminar distintos tipos de alimentos (Tanzi y Gabay, 2002) (EFSA, 2005) (Lindström et al., 2010).

C. botulinum, en función de las toxinas que elabora, se clasifica en siete tipos (A, B, C, D, E, F y G). Los tipos A, B, E, F y G son los que se asocian con el botulismo en el hombre, mientras que los tipos C y D afectan a los animales. No obstante, se han notificado algunos casos esporádicos en el hombre producidos por los tipos C y D (Fenicia y Anniballi, 2009). Generalmente, cada cepa de *C. botulinum* produce una única toxina aunque existen cepas que pueden sintetizar más de una (Arnon, 1984), en cuyo caso se designan en función de la toxina mayoritaria que elaboran (Ab, Af, Ba y Bf). También se han encontrado cepas de *C. butyricum* y *C. baratii*, que manteniendo todas las características típicas de estas dos especies, producen las toxinas E y F, respectivamente (Brook, 2007).

Las cepas de *C. botulinum* también se clasifican en cuatro grupos (I-IV) en función de sus diferentes propiedades bioquímicas y en especial con relación a su capacidad proteolítica. Las cepas de *C. botulinum* que producen el botulismo en el hombre pertenecen a los grupos I (cepas proteolíticas que producen las toxinas A, B y F) y II (cepas no proteolíticas que producen las toxinas B, F y E). Las esporas de las cepas del grupo I son más termorresistentes que las del grupo II. Las toxinas, por el contrario, son todas termolábiles (Lindström et al., 2010).

Con relación al botulismo infantil, los tipos de *C. botulinum* aislados más frecuentemente han sido el A y B, mientras que los tipos E y F se han descrito en menor medida (Lúquez et al., 2010). Asimismo, en la bibliografía se cita un caso producido por *C. botulinum* tipo C (Koepke et al., 2008). También se han identificado cepas que producen las toxinas Ab, Ba y Bf (Fathalla et al., 2008) (Fenicia y Anniballi, 2009). Paralelamente, cepas de *C. butyricum* que producen la neurotoxina E y cepas de *C. baratii* que producen la neurotoxina F se han asociado con casos de botulismo infantil (McCroskey et al., 1991) (Barash et al., 2005) (Abe et al., 2008). La mayor parte de las cepas de *C. botulinum* responsables del botulismo infantil son proteolíticas (Brook, 2007).

La toxina botulínica se considera uno de los compuestos tóxicos más letales para el hombre. Algunos autores establecen la dosis letal oral para el hombre en 1 µg/kg (Sobel, 2005).

Las toxinas botulínicas sintetizadas en el interior de la célula tienen un peso molecular aproximado de 150 kDa y escasa toxicidad. Se liberan al medio al lisarse la célula aunque también pueden hacerlo al final de la fase exponencial de crecimiento. La toxina botulínica no se libera en forma libre sino unida a otras proteínas conocidas como progenitores de la toxina (hemaglutininas y proteínas no hemaglutinantes), cuya función es proteger a la toxina de su degradación y facilitar su fijación a receptores de las células intestinales. La toxina botulínica una vez liberada se desdobra en una cadena pesada (100 kDa) y una cadena ligera (50 kDa) por la acción de proteasas producidas por el microorganismo o presentes en los tejidos (Smith, 2009). Las dos subunidades permanecen unidas por un puente disulfuro y el desdoblamiento ocurre a un tercio aproximadamente del extremo N-terminal. La cadena ligera es una endopeptidasa que contiene Zn^{2+} e hidroliza una o más de las tres proteínas intracelulares (sinaptobrevina, sintaxina y complejo SNAP-25) necesarias para la fusión vesicular y la liberación del neurotransmisor acetilcolina (Pellizzari et al., 1999) (Brook, 2007) provocando, en última instancia, la parálisis flácida característica de esta enfermedad.

En el botulismo infantil, los síntomas que con mayor frecuencia se presentan, tras un periodo de incubación de aproximadamente tres días, son el estreñimiento inicial e inapetencia, y progresivamente disminución de los movimientos, pérdida de la expresión facial, llanto débil, disfunción en la deglución con pérdida del reflejo nauseoso, parálisis oculares, debilidad del tronco e hipotonía generalizada, simétrica y descendente. La evolución de la enfermedad es variable y oscila desde una rápida recuperación cuando los niños son hospitalizados antes de que aparezcan los síntomas respiratorios (Midura, 1996), hasta el fallecimiento. Como se ha comentado en la introducción, *C. botulinum* también se ha asociado a casos de muerte súbita en niños. Böhnelt et al. (2001) llevaron a cabo un estudio durante cinco años en el que analizaron 75 casos que incluían 57 clasificados como de muerte súbita. De las muestras investigadas, en 15 se detectó la toxina o el microorganismo, por lo que estos autores concluyeron que en estos casos se podría atribuir la muerte a *C. botulinum*, recomendando a las autoridades sanitarias que se investigara su presencia en casos de muerte repentina en niños menores de 1 año.

El botulismo infantil se confirma por la detección de las neurotoxinas en heces o por el aislamiento en heces de los microorganismos productores de la toxina (Fenicia y Anniballi, 2009). En las muestras de sangre raramente se encuentran niveles detectables de neurotoxina. En los alimentos sospechosos se investiga la presencia de esporas de *C. botulinum* y en caso positivo, se comprueba si son del mismo tipo que las aisladas del paciente, comparándose posteriormente las cepas mediante técnicas genéticas (Brett et al., 2005) (Barash et al., 2010).

El tratamiento convencional con antitoxina botulínica equina para adultos no está recomendado en niños, ya que su eficacia nunca ha sido evaluada en ensayos controlados y es frecuente la aparición de reacciones anafilácticas (Fox et al., 2005) (Cárdenas et al., 2007). En el año 2003, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó el empleo de inmunoglobulina humana específica (*BabyBIG®*) para el tratamiento de aquellos lactantes en los que se sospeche de esta enfermedad. Se trata de anticuerpos humanos obtenidos a partir de plasmas procedentes de adultos inmunizados que tienen la capacidad

de neutralizar la toxina botulínica circulante en sangre. Desde 2005, el *BabyBIG*^R está disponible para tratar lactantes hospitalizados fuera de Estados Unidos. Antes de disponer de este fármaco, el botulismo infantil se acompañaba de una alta morbilidad (Cárdenas et., al 2007) (López Laso et al., 2008).

2. Relación dosis-respuesta

En el botulismo infantil, la mínima dosis infectiva de esporas de *C. botulinum* cuya ingestión podría desencadenar los síntomas no se conoce con exactitud, aunque se considera comprendida entre 10 y 100 esporas (Bianco et al., 2008). En un estudio intragástrico de dosis-respuesta realizado por Sugiyama y Mills (1978) en crías de ratones, se determinó que la dosis infectiva 50 (ID₅₀) era de 700 esporas de *C. botulinum* y de 1.500 esporas en crías de rata (Moberg y Sugiyama, 1980).

3. Población susceptible

La edad es el único factor de predisposición reconocido en el botulismo infantil. La mayor parte de los casos que se registran se producen en niños con edades comprendidas entre 1 y 52 semanas, siendo la edad media de presentación las 13 semanas (Brook, 2007) (Koepke et al., 2008). También puede afectar, en casos muy excepcionales, a niños de mayor edad con alteraciones intestinales, inmunodeprimidos o después de tratamientos prolongados con antibióticos (Chia et al., 1986) (Freedman et al., 1986) (Griffin et al., 1997).

Los adultos sanos y los niños mayores ingieren con los alimentos esporas de *C. botulinum* de manera habitual sin desarrollar la enfermedad. Este hecho parece deberse a la madurez de la flora intestinal. En los niños de corta edad, la flora intestinal es más simple tanto cualitativa como cuantitativamente, de forma que no impide la colonización de la mucosa por parte de las esporas de microorganismos del género *Clostridium* (Midura, 1996) (Arnon, 2004).

4. Factores de riesgo

Algunos autores han sugerido que el tipo de lactancia, tiempo de lactancia materna, edad en la que se introducen nuevos alimentos, etc., podría influir en la presentación del botulismo infantil (Nevas et al., 2005).

El tipo de leche consumida por los afectados ha sido uno de los principales factores analizados, debido a las diferencias existentes en la composición inmunológica entre la leche materna y las leches comerciales, en cuanto a su influencia sobre la microflora intestinal que es la que debe competir con las esporas de *C. botulinum* en la colonización intestinal. La edad de aparición de los síntomas es menor en el caso de niños alimentados con lactancia artificial (Arnon, 2004), donde la gravedad del proceso suele ser mayor, lo que podría estar relacionado con una menor presencia de inmunoglobulinas A, lactoferrina, lisozima o con el tipo de flora intestinal. Con relación a los niños alimentados con leche materna, se considera que el periodo más crítico es el que coincide con la introducción de nuevos alimentos, lo que iría acompañado de un cambio importante en el tipo de flora intestinal. Sin embargo, son varios los autores que concluyen que no es posible establecer una relación directa entre el tipo de alimentación y la aparición de la enfermedad (Fenicia y Anniballi, 2009).

Otro factor que puede favorecer la aparición del botulismo infantil es la ralentización de la motilidad intestinal, medida como la frecuencia de defecación. Menos de una deposición al día se considera un factor de riesgo tanto para los bebés alimentados con lactancia materna como con lactancia artificial. La existencia de divertículos de Meckel parece ser un factor predisponente en el caso del botulismo infantil producido por *C. butyricum*. Sin embargo, esta relación no se ha demostrado en el caso de *C. botulinum* (Arnon, 2004).

De todos los posibles alimentos que se han tratado de vincular con el botulismo infantil (miel, jarabe de maíz, azúcar, preparados deshidratados para lactantes, cereales, infusiones de especies vegetales, etc.), la miel es el que aparece con mayor frecuencia como responsable de los casos en los que se logra identificar la fuente (Arnon et al., 1979) (Midura, 1996) (Satorres et al., 1999) (SCVMPH, 2002) (Van der Vorst et al., 2006) (Koepeke et al., 2008) (Bianco et al., 2009). No obstante, conviene señalar que en la mayoría de los casos investigados no se llega a esclarecer el origen de las esporas responsables de la enfermedad.

Muchos investigadores han señalado la importancia de las condiciones ambientales que rodean al niño y que facilitan su exposición a las esporas de *C. botulinum*, citándose como factores de riesgo el contacto con polvo o tierra en domicilios ubicados en zonas rurales donde se llevan a cabo actividades agrícolas y ganaderas, así como en áreas urbanas con abundantes zonas en construcción que impliquen movimientos de tierra (Midura, 1996) (Fox et al., 2005).

5. Situación actual mundial

Hasta la fecha, se han documentado casos de botulismo infantil en 26 países de todos los continentes, a excepción de África. Los países que presentan el mayor número de casos son Estados Unidos, Argentina, Australia, Italia, Canadá y Japón (Fenicia y Anniballi, 2009). La falta de notificaciones en África podría ser debida más a la dificultad en el diagnóstico y sistema de registro que a la inexistencia de la enfermedad (Koepeke et al., 2008).

Conviene tener presente que prácticamente toda la información existente sobre el botulismo infantil parte únicamente del estudio de los pacientes ingresados, lo que puede sesgar los resultados obtenidos (Arnon, 2004). De hecho, la incidencia percibida actualmente es más un reflejo de la capacidad del personal sanitario de detectar la enfermedad que de la frecuencia real de la misma.

Dentro del continente americano, en Estados Unidos y en Argentina, el botulismo infantil es, actualmente, la forma más frecuente de botulismo (Arnon, 2004) (Lúquez et al., 2007), siendo Estados Unidos el país donde se notifican, con diferencia, el mayor número de casos a nivel mundial (Koepeke et al., 2008).

En Europa, los casos de botulismo infantil se detectan de manera más homogénea entre los distintos países. Esta circunstancia puede deberse tanto a una capacidad similar de diagnosticar la enfermedad en todos los países, como a una distribución ambiental más homogénea de las esporas, o bien a ambas. En la Unión Europea, el botulismo es una enfermedad de declaración obligatoria. Sin embargo, su declaración no precisa de separación por edades o por forma de presentación, por lo que los datos específicos de botulismo infantil existentes se refieren principalmente a casos documentados y publicados. De acuerdo con Koepeke et al. (2008), hasta el año 2006 se habían notificado en Europa un total de 65 casos de botulismo infantil, siendo Italia el país con mayor número de notificaciones.

En España, de acuerdo con el estudio realizado por Koepke et al. (2008), desde 1985 a 2002 hay referencias de nueve casos de botulismo infantil. De estos nueve casos, en cuatro se determinó el tipo de toxina, siendo A en dos de los casos y B en los otros dos. En la bibliografía consultada se encuentran referencias de algunos casos más (Lizarraga et al., 1996) (Cárdenas et al., 1997) (López Laso et al., 2008).

La variabilidad entre países e incluso dentro de un mismo país a la hora de informar sobre los casos de botulismo infantil, podría reflejar la heterogénea distribución medioambiental de las esporas. En Argentina, en algunos estudios, se ha encontrado una relación directa entre la incidencia de botulismo infantil y la presencia de esporas de *C. botulinum* en determinadas regiones (Lúquez et al., 2005, 2007). Además de las diferentes capacidades de detección de la enfermedad y de la documentación de los casos, la variabilidad en la incidencia entre países podría atribuirse a prácticas culturales relativas a la administración a los lactantes de miel, infusiones u otros alimentos infantiles, junto con una diferente exposición al polvo o al suelo y también a una variabilidad en la susceptibilidad de los pacientes debida a causas aún desconocidas (Koepke et al., 2008).

Evaluación de la exposición

1. Presencia de *Clostridium botulinum* en alimentos y otras fuentes

Las esporas de *C. botulinum* están distribuidas ampliamente en el suelo y en los sedimentos acuáticos, pudiendo contaminar distintos tipos de alimentos (Tanzi y Gabay, 2002) (EFSA, 2005) (Lindström et al., 2010).

Distintos estudios que han evaluado la presencia de esporas de *C. botulinum* en suelos y sedimentos acuáticos de Estados Unidos, Canadá, América Central y del Sur, Europa, África, Indonesia, Australia y Nueva Zelanda, han puesto de manifiesto que la incidencia de botulismo infantil y el tipo de toxina responsable están directamente relacionados con el grado de contaminación de los suelos y con el tipo de esporas presentes en ellos (Fenicia y Anniballi, 2009).

En Estados Unidos, la FDA llevó a cabo en el año 1982 un amplio estudio en el que se examinaron diez categorías de alimentos infantiles para determinar la posible presencia de esporas de *C. botulinum*. Se analizaron un elevado número de muestras que incluían cereales deshidratados (90), preparados deshidratados para lactantes (100), leche en polvo desnatada (100), leche entera (90), frutas enlatadas (100), zumos de frutas (100), miel (100), jarabe de maíz (40), azúcar (90) y zanahorias cocidas (100). Los resultados obtenidos sólo pusieron de manifiesto la presencia de esporas de *C. botulinum* tipo A en dos de las 100 muestras de miel analizadas así como la presencia de esporas de *C. botulinum* tipo B en ocho de las 40 muestras de jarabe de maíz. Dado que no existían datos previos de la presencia de esporas de *C. botulinum* en jarabe de maíz, se consideró conveniente realizar un muestreo más amplio a nivel nacional, tomando muestras de diferentes supermercados y establecimientos comerciales que garantizase un mayor número de proveedores. De las 961 muestras envasadas analizadas, cinco contenían esporas de *C. botulinum* tipo B en niveles aproximados de 1,25 esporas/25 g (Kauter et al., 1982). A raíz de los resultados obtenidos en este estudio, la FDA recomendó que se evitase el consumo de miel y jarabe de maíz en niños menores de un año. Conviene destacar que Estados Unidos es el país que notifica un mayor número de casos de botulismo infantil. En 2009, según los datos que aporta el

CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), se registraron 121 casos de botulismo, de los que 84 (69%) correspondieron al botulismo infantil (CDC, 2009).

Un estudio bastante similar al mencionado se realizó en Canadá en el año 1988 para determinar la presencia de esporas de *C. botulinum* en alimentos infantiles. Se analizaron 150 muestras de miel, 43 de jarabe de maíz y 40 de cereales deshidratados. Los resultados obtenidos sólo pusieron de manifiesto la presencia de esporas de *C. botulinum* en una muestra de arroz y en una muestra de miel sospechosa de estar implicada en un caso de botulismo infantil (Hauschild et al., 1988).

Miel

Como se ha señalado, de los posibles alimentos responsables del botulismo infantil, la miel es el que con mayor frecuencia se ha vinculado con casos de enfermedad, no sólo en Estados Unidos sino también en Europa (Aureli et al., 2002) (Tanzi y Gabay, 2002).

El consumo de miel en niños menores de un año es relativamente bajo, y aún más, desde la existencia de recomendaciones sanitarias en algunos países que desaconsejan su utilización (Arnon et al., 1979) (SCVMPH, 2002). Algunas empresas de Estados Unidos y Reino Unido incluyen en el etiquetado de los envases de miel la mención de producto no indicado para niños menores de 12 meses (Arnon, 2004) (Koepke et al., 2008) por lo que varios autores señalan que la prevalencia del botulismo infantil asociado al consumo de miel podría haber disminuido desde la aparición de estas recomendaciones (Fenicia y Anniballi, 2009).

La presencia de esporas de *C. botulinum* en la miel puede provenir del polen, del tracto digestivo de las abejas, polvo, aire, tierra, agua y néctar. Otras fuentes de contaminación derivarían de los equipos, utillaje, contaminaciones cruzadas, etc., durante el procesado posterior (SCVMPH, 2002). El número de esporas en las muestras de miel asociadas a casos de enfermedad oscilaría entre 5 y 80 esporas/g.

En Europa, uno de los primeros casos de botulismo infantil atribuido al consumo de miel fue descrito por Fenicia et al. (1993). En este caso, se aisló la misma cepa de *C. botulinum* tipo B tanto de las heces del lactante de nueve semanas de edad como de las muestras de miel procedentes del envase que había consumido. La información recogida puso de manifiesto que la miel se había administrado al lactante con la única finalidad de calmarle y paliar su llanto. En este sentido, una encuesta realizada en Italia a 270 mujeres, reveló que un 25% proporcionaban miel a los lactantes sin ser conscientes del riesgo que tal práctica conllevaba (Aureli et al., 2002).

Castell y Nieto (1999) describen un caso similar en España asociado al consumo de miel, en un niño de 2 meses de edad. Entre los antecedentes epidemiológicos se encontró que el niño estaba siendo alimentado con lactancia materna además de con una fórmula láctea, manifestando la madre que en ocasiones le impregnaba el chupete con pequeñas cantidades de miel. En los análisis de heces y suero se detectó toxina botulínica tipo B. Los resultados de los análisis de la leche adaptada del envase consumido por el niño dieron negativo, pero en las muestras de miel se encontraron esporas de *C. botulinum* tipo B. En este caso se pudo demostrar en la miel la presencia de esporas de *C. botulinum* productoras del mismo tipo de toxina que la encontrada en las heces del lactante. Los autores consideran que en España es probable que haya casos sin diagnosticar debido al espectro clínico variable que presenta la enfermedad y, por tanto, a la dificultad de su diagnóstico.

En un estudio posterior, Nevas et al. (2002), en Finlandia, analizaron 190 muestras de miel para detectar la presencia de esporas de *C. botulinum* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los resultados mostraron la presencia de esporas de *C. botulinum* en 8 (7%) de las 114 muestras de miel finlandesas analizadas y en 12 (16%) de las 76 muestras de mieles importadas procedentes de 16 países. El número de esporas en las muestras varió entre 18 y 140 esporas/kg. El gen que codificaba por la neurotoxina A se detectó en 14 muestras y el de la neurotoxina B en 2. En otro estudio, estos mismos autores analizaron 294 muestras de miel producidas en Dinamarca, Noruega y Suecia mediante una técnica de PCR múltiple. El porcentaje de muestras positivas varió en función del origen. En las mieles procedentes de Dinamarca, los aislamientos resultaron mayores con un 26% de muestras positivas, seguidas de las de Noruega con un 10% y Suecia con un 2%. Las esporas de *C. botulinum* tipo B fueron las más frecuentemente identificadas. La mayor presencia de muestras positivas en las mieles procedentes de Dinamarca se relacionó en este estudio con el elevado número de explotaciones porcinas existentes en este país. Un estudio previo realizado por Dahlenborg et al. (2001), puso de manifiesto una prevalencia de esporas de *C. botulinum* del 62% en muestras fecales de cerdos sacrificados en el matadero. Dinamarca destaca por su elevada producción porcina con más de 13 millones de animales en un área de tan sólo 43.094 km². El empleo habitual de los purines como fertilizantes puede contribuir a una amplia diseminación de esporas en el suelo y agua, de forma que las abejas entrarían fácilmente en contacto con ellas, lo que explicaría, según los autores del estudio, la mayor presencia de muestras positivas en las mieles procedentes de Dinamarca. La presencia de esporas de *C. botulinum* en la miel sería un reflejo de la contaminación existente en el medio ambiente. Un análisis de suelos realizado en Dinamarca y Suecia puso de manifiesto la presencia de esporas de *C. botulinum* en un 30% de las muestras de suelos analizadas (Huss, 1980).

Nevas et al. (2006) realizaron un estudio para identificar la posible presencia de esporas de *C. botulinum* en colmenas e instalaciones de procesado de miel. Analizaron 1.168 muestras procedentes de 100 colmenas y equipamientos durante el periodo 2001-2003. Se registraron datos concernientes a los métodos de procesado y condiciones ambientales del entorno. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la habitual presencia de esporas de *C. botulinum* a lo largo de toda la cadena de producción, siendo *C. botulinum* tipo B el más frecuentemente identificado. El número aproximado de esporas en las muestras positivas osciló entre 60 y 1.200 esporas/kg, con una media de 180 esporas.

Otros estudios realizados en los que se analizaron muestras de miel adquiridas en establecimientos minoristas, detectaron esporas de *C. botulinum* en mieles de Estados Unidos (10%), Japón (7,5%), Italia (6,5%) y Turquía (12,5%) (SCVMPH, 2002) (Küplülü et al., 2006). Hay que tener presente que no es factible aplicar un tratamiento térmico suficiente para destruir las esporas de *C. botulinum* presentes en la miel sin modificar las características organolépticas del producto final (Nevas et al., 2006).

Las fuentes de exposición de los niños menores de 1 año a la miel son diversas y están muy relacionadas con las costumbres de cada país e incluso de cada región. Las vías más frecuentes consistirían en añadir miel a los alimentos infantiles, untar miel en el pezón de la madre antes de cada toma, en los labios del bebé o en el chupete para reducir la ansiedad o el llanto (SCVMPH, 2002). Como ya se ha señalado, son numerosas las instituciones que como la FDA y la OMS (Organización Mundial de la Salud) recomiendan que se evite el consumo de miel en menores de 1 año.

Preparados deshidratados para lactantes

Además de la miel, otro de los alimentos que se han analizado como posible fuente de exposición a las esporas de *C. botulinum* son los preparados deshidratados para lactantes. En principio, no puede excluirse la presencia de esporas de *C. botulinum* en la leche recién obtenida, aunque su presencia probablemente es baja. Asimismo, las esporas pueden incorporarse en el procesado posterior y sobrevivir a los tratamientos térmicos aplicados (Lindström et al., 2010).

Aunque estudios previos realizados en muestras de preparados deshidratados para lactantes no habían puesto de manifiesto la presencia de esporas de *C. botulinum* (Kauter et al., 1982) (Hauschild et al., 1988), la notificación en 2001, en el Reino Unido, de un caso de botulismo infantil en un niño de 5 meses de edad asociado a este tipo de productos despertó la alarma y la necesidad de determinar la presencia de esporas. En el Reino Unido, dada la baja frecuencia de presentación de botulismo infantil, se llevaron a cabo dos estudios independientes para esclarecer el origen de las esporas de *C. botulinum*. Los resultados publicados por Johnson et al. (2005) pusieron de manifiesto que el caso notificado se habría originado por una cepa de *C. botulinum* tipo B aislada tanto de las heces del lactante como de las muestras del preparado deshidratado que había ingerido el niño. También se analizaron muestras de cinco preparados del mismo lote sin abrir. Para la caracterización de las cepas se emplearon técnicas microbiológicas de cultivo con caracterización fenotípica, tipificación de la neurotoxina y electroforesis de campos pulsantes (PFGE). Los patrones de bandas obtenidos mediante PFGE de la cepa aislada de heces y del preparado que había ingerido el lactante resultaron similares, mientras que el patrón obtenido de una cepa aislada del único preparado no abierto en el que se confirmó la presencia de esporas resultó diferente. Estos autores concluyeron que no era posible establecer con certeza si el origen de las esporas en el preparado ingerido por el lactante provenía del propio preparado, o bien de una contaminación del producto una vez abierto el envase. No se realizaron estudios de toma de muestras del entorno del lactante, si bien el domicilio estaba próximo a un edificio en construcción, de forma que el movimiento de tierras y el subsiguiente polvo generado podrían haber liberado las esporas. Asimismo, estos investigadores señalaron que si la contaminación del lote hubiese sido elevada, dado que éste estaba compuesto por 122.388 unidades fabricadas en octubre de 1998 y consumidas por unos 30.000 lactantes durante tres años, lo esperable es que se hubiesen registrado más casos de botulismo infantil, lo que no aconteció.

El otro estudio de laboratorio relacionado con este caso fue desarrollado por Brett et al. (2005). Estos investigadores confirmaron la presencia de neurotoxina de *C. botulinum* tipo B en las heces del lactante. Asimismo, identificaron en nueve aislamientos de heces de *C. botulinum* tipo B dos perfiles diferenciables, mediante el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). De los análisis de muestras tomadas en el domicilio del paciente, aislaron *C. botulinum* tipo A de un envase abierto de *pudding* de arroz deshidratado con frutas y *C. botulinum* tipo B de un envase también abierto del preparado deshidratado para lactantes que había ingerido el niño. De los diez aislamientos obtenidos de *C. botulinum* tipo B se obtuvieron cuatro perfiles diferentes mediante la técnica de AFLP, de los que dos resultaron similares a los obtenidos en los aislamientos de heces. En los análisis de 14 muestras procedentes de envases sin abrir del mismo lote del preparado sospechoso, sólo se identificó *C. botulinum* en las muestras de un envase y con un perfil diferente. Los análisis practicados en diez

envases sin abrir del *pudding* de arroz deshidratado con frutas del mismo lote resultaron negativos. Los autores concluyeron que se pueden encontrar múltiples cepas de *C. botulinum* tanto en los alimentos como en el tracto intestinal de los afectados.

Con estos antecedentes, Barash et al. (2010) realizaron un interesante estudio durante dos años para determinar la posible presencia de *C. botulinum* y de otros clostridios en los preparados deshidratados ingeridos por niños hospitalizados por botulismo infantil. Asimismo, analizaron muestras adquiridas en establecimientos comerciales. De las 39 muestras analizadas, en 12 (31%) se aislaron esporas de clostridios, pero en ninguna de las muestras se identificaron esporas de *C. botulinum*, *C. baratii* o *C. butyricum*. Entre las especies identificadas se encontraban *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi/haemolyticum* y *C. sporogenes*. El número más probable de esporas en las muestras positivas osciló entre 1,1 y 23 esporas/100 g. *C. sporogenes* resultó ser la especie aislada con mayor frecuencia. La mayor parte de las muestras investigadas contenían, además, esporas pertenecientes a distintas especies del género *Bacillus*. Aunque no se aislaron esporas de *C. botulinum*, la presencia de otras esporas de *Clostridium* y de *Bacillus* con similar hábitat pone de manifiesto la posibilidad de que este tipo de preparados pueda contener también esporas de *C. botulinum*.

Los preparados deshidratados para lactantes no son productos estériles y de hecho en algunas ocasiones se han vinculado a cuadros de toxiinfecciones alimentarias en los que los microorganismos identificados han sido *Salmonella* spp. y *Cronobacter sakazakii* (Baker, 2002). En Estados Unidos, la FDA considera que en los preparados deshidratados para lactantes no son necesarios controles adicionales a los establecidos para *Salmonella* spp. y *Cronobacter sakazakii* (FDA, 2006). Esta opinión deriva de la decisión adoptada por la FAO/OMS (2006), que concluye que estos dos microorganismos son los que con mayor frecuencia se han vinculado con enfermedades en lactantes asociadas a la ingesta de este tipo de preparados.

En Europa, el Reglamento (CE) Nº 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, (UE, 2007) establece criterios de seguridad alimentaria en los preparados deshidratados para lactantes, siendo el criterio establecido la ausencia de *Salmonella* en 25 g y la ausencia de *Cronobacter sakazakii* en 10 g de muestra. Este mismo Reglamento introduce en los criterios de higiene del proceso, el control al final del proceso de fabricación de esporas de presunto *Bacillus cereus* con un valor m de 50 ufc/g y un valor M de 500 ufc/g. Cuando los resultados sean insatisfactorios, la normativa establece mejoras en la higiene de la producción, prevención de la recontaminación y mejoras en la selección de las materias primas. Aunque la normativa actual no recoge ningún control de esporas de *C. botulinum* en los preparados deshidratados para lactantes, podría ser conveniente que las industrias elaboradoras adoptaran medidas preventivas que garantizaran la ausencia de esporas de esta bacteria en el producto final.

Especies vegetales para infusiones

La presencia de esporas de *C. botulinum* en especies vegetales que se utilizan en infusiones puede provenir del aire, agua o suelo donde se cultivaron, así como de contaminaciones cruzadas durante el procesado posterior y/o preparación final para su consumo. El tratamiento térmico aplicado a la infusión no es suficiente para garantizar su destrucción.

En varios países de Centro y Sudamérica, al igual que en países del área mediterránea como España o Italia, es una práctica relativamente habitual preparar infusiones con especies vegetales recolectadas por el propio usuario o comerciales, para tratar los cólicos intestinales de niños, principalmente lactantes, o simplemente como bebida (Satorres et al., 1999) (Fenicia y Anniballi, 2009).

Satorres et al. (1999) publicaron un estudio en el que analizaron 100 muestras de diferentes especies vegetales con el objetivo de detectar la presencia de esporas de *C. botulinum*. De las 100 muestras, sólo cuatro (4%) contenían esporas de *C. botulinum* tipo A. Los aislamientos se realizaron en poleo criollo (*Lippia turbinata*), hierba del pollo (*Alternanthera pungens*), anís (*Pimpinella anisum*) y sen (*Senna acutifolia*), si bien el número de muestras de cada especie botánica fue pequeño y en el trabajo no se especificaba si las esporas se encontraban en una, varias o en todas las muestras correspondientes a una misma planta.

Bianco et al. (2008) llevaron a cabo el análisis de 200 muestras de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) con la finalidad de detectar la presencia de esporas de *C. botulinum*. El 7,5% de las muestras contenían esporas. Los resultados pusieron de manifiesto una mayor presencia de esporas en las muestras adquiridas al peso que en las envasadas. El nivel de presencia de esporas en las muestras positivas oscilaba entre 0,3-0,4 esporas/g de manzanilla. En el estudio se identificaron los tipos A, B y F en el 53,3%, 6,7% y 13,3% de las muestras positivas respectivamente, mientras que en el 6,7% se aislaron una mezcla de los tipos A y F. En el 20% restante no fue posible la tipificación. Los autores concluyeron que aunque el número de esporas en las muestras era inferior al que se considera podría ser necesario para originar la enfermedad, las infusiones no deberían ser ingeridas por niños menores de 1 año dado que éstas se suelen preparar con varios gramos de la planta, al tiempo que pueden administrarse varias veces al día y en días sucesivos. Como la presencia de esporas en las plantas parece ser consecuencia directa de su existencia en el suelo, estos mismos autores, en un trabajo previo, analizaron 2.009 muestras de suelo procedentes de cinco regiones de Argentina y encontraron esporas de *C. botulinum* en un 23,5% de las muestras (Lúquez et al., 2005).

También se ha investigado la presencia de esporas de *C. botulinum* en tila (*Tilia* spp.), planta igualmente empleada en la preparación de infusiones para su administración a lactantes. Se analizaron 100 muestras procedentes de la recolección directa de las flores en el propio árbol y otras 100 de preparados comerciales, envasados en bolsas para infusión. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que un 3% de las muestras de las flores recolectadas contenían un valor medio de 30 esporas/100 g. *C. botulinum* tipo A se identificó en dos muestras y *C. botulinum* tipo B en una. Por el contrario, en ninguno de los preparados comerciales se aislaron esporas de *C. botulinum* (Bianco et al., 2009).

En España, López Laso et al. (2008) analizaron un caso de botulismo infantil que se presentó en el año 2007 en Córdoba en un lactante de 40 días alimentado con una fórmula de inicio y que también había ingerido una infusión de manzanilla e hinojo (*Foeniculum vulgare*). El hecho de que dos meses más tarde se detectara un segundo caso en Huelva en otro lactante que también había consumido el mismo tipo de infusión despertó sospechas en cuanto a la posibilidad de que la exposición a las esporas de *C. botulinum* tuviera ese origen. Sin embargo, no se aislaron esporas de *C. botulinum* en ninguna de las muestras procedentes de los envases de la fórmula de inicio y de la infusión ingeridas

por el lactante. En los análisis de heces se detectó la neurotoxina tipo B así como las esporas de *C. botulinum* tipo B.

Dado que los métodos de procesado no pueden garantizar la ausencia de esporas de *C. botulinum* en algunas infusiones de especies vegetales, se recomienda evitar su consumo en niños menores de 12 meses. La inclusión de esta información en el etiquetado de los productos podría contribuir a disminuir la incidencia de la enfermedad.

Presencia de *Clostridium botulinum* en el polvo

Las esporas de *C. botulinum* presentes en el polvo pueden también contaminar los alimentos que se administran al lactante. Asimismo, las esporas pueden ser inhaladas directamente por el niño y pasar al tracto intestinal, o bien acceder al lactante por vía oral cuando el niño gatea y entra en contacto con objetos contaminados o se introduce las manos sucias de polvo en la boca.

Nevas et al. (2005) demostraron en un niño de 11 semanas fallecido de forma súbita, en lo que se confirmó posteriormente como un caso de botulismo infantil, que el origen de las esporas de *C. botulinum* era el polvo del hogar. Los resultados negativos obtenidos en el preparado para lactantes que ingería el niño y descartada la miel como fuente de exposición a las esporas, los investigadores tomaron muestras de tierra de las plantas de la vivienda así como del polvo de la bolsa de la aspiradora doméstica. Mediante una técnica de PCR se confirmó, en el polvo extraído de la aspiradora, la presencia de esporas de *C. botulinum* tipo B que resultaron similares a las aisladas del contenido intestinal del niño mediante las técnicas de electroforesis en campos pulsantes (PFGE) y amplificación con cebadores arbitrarios (RAPD). En ambas cepas se confirmó la producción de la neurotoxina B mediante el bioensayo en ratón. El resto de muestras tomadas en la vivienda resultaron negativas.

Los movimientos de tierra, como los producidos en zonas donde se construyen viviendas, carreteras, etc., contribuyen a la dispersión de las esporas que pueden fácilmente acceder a viviendas próximas. Las prácticas agrícolas y ganaderas que implican trabajos con tierra, o habitar en zonas ventosas, se consideran también factores de riesgo en cuanto a que facilitan una mayor exposición a las esporas. En otros países, la mayoría de los casos se presentan en ciudades y probablemente puedan estar relacionados con el polvo generado por obras de rehabilitación de inmuebles (Fenicia y Anniballi, 2009).

Caracterización del riesgo

El botulismo infantil se presenta en niños con edades comprendidas entre 1 y 52 semanas, que ingieren esporas de *C. botulinum*. De todos los posibles alimentos que se han tratado de vincular con el botulismo infantil (miel, jarabe de maíz, preparados deshidratados para lactantes, cereales e infusiones de especies vegetales), la miel es el que aparece con mayor frecuencia como responsable de los casos en los que se logra identificar la fuente. Por tanto, se considera que el riesgo de padecer la enfermedad podría calificarse en términos generales de bajo si en los niños menores de 12 meses se evita la ingestión de miel, así como de infusiones de especies vegetales.

Para disminuir aún más el riesgo, es conveniente minimizar la exposición de los lactantes al polvo en los domicilios en los que residen tanto en zonas rurales donde se llevan a cabo actividades agrícolas y

ganaderas, como en áreas urbanas con abundantes zonas en construcción que impliquen movimientos de tierra, o cuando se realicen obras de rehabilitación en los inmuebles.

Conclusiones del Comité Científico

1. La edad es el único factor de predisposición reconocido en el botulismo infantil. La mayor parte de los casos que se registran se producen en niños con edades comprendidas entre 1 y 52 semanas, siendo la edad media de presentación las 13 semanas. En el botulismo infantil, la mínima dosis infectiva de esporas de *C. botulinum* que podría desencadenar los síntomas se considera comprendida entre 10 y 100 esporas.
2. La mayor parte de las investigaciones realizadas indican que no es posible establecer una relación directa entre el tipo de alimentación del niño (tipo de lactancia, tiempo de lactancia materna, edad en la que se introducen nuevos alimentos, etc.) y la aparición de la enfermedad.
3. Conviene tener presente que prácticamente toda la información existente sobre el botulismo infantil procede únicamente del estudio de los pacientes ingresados, lo que puede sesgar los resultados obtenidos. De hecho, la incidencia percibida actualmente es más un reflejo de la capacidad del personal sanitario de detectar la enfermedad que de la frecuencia real de la misma.
4. La contaminación de los suelos y sedimentos acuáticos con esporas de *C. botulinum* determina su presencia potencial en alimentos no sometidos a tratamientos térmicos que garanticen su destrucción. De todos los posibles alimentos que se han tratado de vincular con el botulismo infantil, la miel es el que con mayor frecuencia aparece como responsable en los casos en los que se logra identificar la fuente. En menor medida, las infusiones de algunas especies vegetales han estado también implicadas. No obstante, en la mayoría de las ocasiones no es posible esclarecer el origen de las esporas responsables de la enfermedad. Asimismo, las esporas de *C. botulinum* presentes en el polvo podrían ser inhaladas directamente por el niño y pasar al tracto intestinal, o bien acceder al lactante por vía oral cuando el niño gatea o entra en contacto con objetos contaminados.
5. Dado que los métodos de procesado no pueden garantizar la ausencia de esporas de *C. botulinum* en la miel ni en algunas infusiones de especies vegetales, este Comité Científico recomienda evitar su consumo en niños menores de 12 meses. La inclusión de esta información en el etiquetado de los productos podría contribuir a disminuir la incidencia de la enfermedad. Asimismo, es importante evitar prácticas consistentes en untar miel en el pezón de la madre antes de cada toma, en los labios del bebé o en el chupete para reducir la ansiedad o el llanto.
6. Cuando se investiguen casos de botulismo infantil, sería conveniente que el análisis de muestras incluyera además de los alimentos sospechosos, muestras del polvo de la aspiradora doméstica, tierra de macetas, o del polvo del entorno del niño, sobre todo en domicilios ubicados en zonas rurales donde se llevan a cabo actividades agrícolas y ganaderas, así como en áreas urbanas con abundantes zonas en construcción que impliquen movimientos de tierra, o cuando se realicen obras de rehabilitación en los inmuebles.
7. Sería importante reforzar la educación sanitaria respecto a esta enfermedad y especialmente a través del personal sanitario que trabaja en atención primaria para que trasladaran a los padres y cuidadores de los lactantes las recomendaciones mencionadas.

Referencias

- Abe, Y., Negasawa, T., Monma, C. y Oka, A. (2008). Infantile botulism caused by *Clostridium butyricum* type E toxin. *Pediatric Neurology*, 38, pp: 55-57.
- Arnon, S.S., Midura, T.F., Damus, K., Thompson, B., Wood, R.M. y Chin, J. (1979). Honey and other environmental risk factors for infant botulism. *The Journal of Pediatrics*, 94, pp: 331-336.
- Arnon, S.S. (1984). Breast feeding and toxigenic intestinal infections: missing links in crib death? *Reviews of Infectious Diseases*, 6 (1), pp: 193-201.
- Arnon, S.S., Schechter, R., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., Barlett, J., Ascher, M.S., Eitzen, E., Fine, A.D., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S., Osterholm, M.T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T.M., Russell, P.K., Swerdlow, D.L. y Tonat, K. (2001). Botulinum toxin as biological weapon. *Journal of the American Medical Association*, 285, pp: 1059-1070.
- Arnon, S.S. (2004). Infant botulism. En libro: Text book of Pediatric Infectious Diseases, 5th edition. Feignen, R.D., Cherry, J.D. y Kaplan, S.L. Filadelfia, PA. Sanders, pp: 1758-1766.
- Aureli, O., Franciosa, G. y Fenicia, L. (2002). Infant botulism and honey in Europe: a commentary. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 21, pp: 866-868.
- Baker, R.D. (2002). Infant formula safety. *Pediatrics*, 110, pp: 883-835.
- Barash, J.R., Tang, T.W. y Arnon, S.S. (2005). First case of infant botulism caused by *Clostridium baratii* type F in California. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, pp: 4280-4282.
- Barash, J.R., Hsia, J.K. y Arnon, S.S. (2010). Presence of soil-dwelling clostridia in commercial powdered infant formulas. *Journal of Pediatrics*, 156, pp: 402-408.
- Barry, J., Ward, M., Cotter, S., MacDiarmada, J., Hannan, M., Sweeney, B., Grant, K.A. y McKeown, P. (2009). Botulism in injecting drugusers, Dublin, Ireland, November-December 2008. *Eurosurveillance*, 14, pp: 1-3.
- Bianco, M.I., Lúquez, C., de Jong, L.I.T. y Fernández, R.A. (2008). Presence of *Clostridium botulinum* spores in *Matricaria chamomilla* (chamomile) and its relationship with infant botulism. *International Journal of Food Microbiology*, 121, pp: 357-360.
- Bianco, M.I., Lúquez, C., de Jong, L.I.T. y Fernández, R.A. (2009). Linden flower (*Tilia* spp.) as potential vehicle of *Clostridium botulinum* spores in the transmission of infant botulism. *Revista Argentina de Microbiología*, 41, pp: 232-236.
- Böhnel, H., Behrens, S., Loch, P., Lube, K. y Gessler, F. (2001). Is there a link between infant botulism and sudden infant death? Bacteriological results obtained in Central Germany. *European Journal of Pediatrics*, 160, pp: 623-628.
- Brett, M.M., McLaughlin, J., Harris, A., O'Brien, S., Black, N., Forsyth, R.J., Roberts, D. y Bolton, F.J. (2005). A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder: evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food. *Journal Medical Microbiology*, 54, pp: 769-776.
- Brook, I. (2007). Infant botulism. *Journal of Perinatology*, 27, pp: 175-180.
- Cárdenas, M.J., Tejera, I., Gil Navarro, M.V. y López-Laso, E. (2007). Botulismo infantil tratado con inmunoglobulina botulínica humana. *Farmacia Hospitalaria*, 31, pp: 379-387.
- Castell, J. y Nieto, A. (1999). Botulismo infantil. *Anales Españoles de Pediatría*, 51, pp: 572-573.
- CDC (2009). Centers for Disease Control and Prevention. 2009 CSTE Botulism Surveillance Summary. Disponible en: http://www.cdc.gov/national-surveillance/PDFs/Botulism_CSTE_2009.pdf [acceso: 10-3-2011].
- Chia, J.K., Clark, J.B., Ryan, C.A. y Pollack, M. (1986). Botulism in an adult associated with food-borne intestinal infection with *Clostridium botulinum*. *New England Journal of Medicine*, 315, pp: 239-241.
- Dahlenborg, M., Borch, E. y Rådström, P. (2001). Development of a combined selection and enrichment PCR procedures for *Clostridium botulinum* types B, E, and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp: 4781-4788.
- EFSA (2005). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to *Clostridium* spp. in foodstuffs. *The EFSA Journal*, 199, pp: 1-65.

- FAO/OMS (2006). Food and Agriculture Organization/World Health Organization meeting. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jemra/e_sakazakii_salmonella.pdf.
- Fathalla, W.M., Mohammed, K.A. y Ahmed, E. (2008). Infant botulism type Ba: first culture-confirmed case in the United Arab Emirates. *Pediatric Neurology*, 39, pp: 204-206.
- FDA (2006). Food and Drug Administration. 21CFR Parts 106 and 107. Proposed rule. Disponible en: <http://edocket.access.gpo.gov/2006/pdf/E6-12268.pdf> [acceso: 20-6-11].
- Fenicia, L., Ferrini, A.M., Aureli, P. y Pocecco, M. (1993). A case of infant botulism associated with honey feeding in Italy. *European Journal of Epidemiology*, 9, pp: 671-673.
- Fenicia, L., Da Dalt, L., Anniballi, F., Franciosa, G., Zanconato, S y Aureli, P. (2002). A case of infant botulism due to neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* type E associated with *Clostridium difficile* colitis. *European Journal of Clinical Microbiological Infectious Disease*, 21, pp: 736-738.
- Fenicia, L. y Anniballi, F. (2009). Infant botulism. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 45, pp: 134-146.
- Fox, C.K., Keet, C.A. y Strober, J.B. (2005). Recent advances in infant botulism. *Pediatric Neurology*, 32, pp: 149-154.
- Freedman, M., Armstrong, R.M., Killian, J.M. y Boland, D. (1986). Botulism in a patient with jejunoileal bypass. *Annals of Neurology*, 20, pp: 641-643.
- Gimenez, J.A., Gimenez, M.A. y Dasgupta, B.R. (1992). Characterization of the neurotoxin isolated from a *Clostridium baratii* strain implicated in infant botulism. *Infection and Immunity*, 60, pp: 518-522.
- Griffin, P.M., Hatheway, C.L., Rosenbaum, R.B. y Sokolow, R. (1997). Endogenous antibody production to botulinum toxin in an adult with intestinal colonization botulism and underlying Crohn's disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 175, pp: 633-637.
- Hatheway, C.L. (1990). Toxigenic Clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, 3, pp: 66-98.
- Hauschild, A.H.W., Hilsheimer, R., Weiss, K.F. y Burke, R.B. (1988). *Clostridium botulinum* in honey, syrups and dry infant cereals. *Journal of Food Protection*, 51, pp: 892-894.
- Huss, H.H. (1980). Distribution of *Clostridium botulinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, pp: 764-769.
- Johnson, E.A., Tepp, W.H., Bradshaw, M., Gilbert, R.J., Cook, P.E. y McIntosh, D.G. (2005). Characterization of *Clostridium botulinum* strains associated with an infant botulism case in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, pp: 2602-2607.
- Kautter, D.A., Lilly, T., Solomon, H.H. y Lynt, R. (1982). *Clostridium botulinum* spores in infant foods: a survey. *Journal of Food Protection*, 45, pp: 1028-1029.
- Koepke, R., Sobel, J. y Arnon, S. (2008). Global occurrence of infant botulism, 1976-2006. *Pediatrics*, 122, pp: 73-81.
- Küplülü, Ö., Göncüoğlu, M., Özdemir, H. y Koluman, A. (2006). Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. *Food Control*, 3, pp: 222-224.
- Kuusi, M., Hasseltvedt, V. y Aavitsaland, P. (1999). Botulism in Norway. *Eurosurveillance*, 4, pp: 44.
- Lindström, M., Myllykoski, J., Sivela, S. y Korkeala, H. (2010). *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, pp: 281-304.
- Lizarraga, M.A., López, Y., Orive, P., Latorre, J., Hermana Tezanos, T. y Rivera, A. (1996). Botulismo infantil: A propósito de un caso. *Anales Españoles de Pediatría*, 44, pp: 399-401.
- López Laso, E., Pérez Navero, J.L., Rumbao Aguirre, J., Mateos González, M.E., Méndez García, M., Cárdenas Aranzana, M.J. e Ibarra de la Rosa, I. (2008). Botulismo del lactante. *Anales de Pediatría*, 68, pp: 499-502.
- Lúquez, C., Bianco, M.I., de Jong, L.I., Sagua, M.D., Arenas, G.N., Ciccarelli, A.S. y Fernández, R.A. (2005). Distribution of botulinum toxin-producing clostridia in soils of Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, pp: 4137-4139.
- Lúquez, C., Bianco, M.I., Sagua, M.D., Barzola, C.P., de Jong, L.I.T., Degarbo, S.M. y Fernández, R.A. (2007). Relationship between the incidence of infant botulism and the presence of botulinum-toxin producing clostridia in the soil of Argentina from 1982-2005. *Journal of Pediatric Neurology*, 5, pp: 279-286.
- Lúquez, C., Dykes, J.K., Yu, P.A., Raphael, B.H. y Maslanka, S.E. (2010). First report worldwide of an infant botulism case due to *Clostridium botulinum* type E. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, pp: 326-328.

- McCroskey, L.M., Hatheway, C.L., Woodruff, B.A., Greenberg, J.A. y Jurgenson, P. (1991). Type F botulism due to neurotoxicogenic *Clostridium baratii* from an unknown source in an adult. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, pp: 2618-2620.
- Midura, T.F. y Aron, S.S. (1976). Identification of *Clostridium botulinum* and its toxins in faeces. *The Lancet*, 2, pp: 934-936.
- Midura, T.F. (1996). Update: infant botulism. *Clinical Microbiological Reviews*, 9, pp: 119-125.
- Moberg, LL.J. y Sugiyama, H. (1980). The rat as an animal model for infant botulism. *Infection and Immunity*, 29, pp: 819-821.
- Nevas, M., Hielm, S., Lindström, M., Horn, H., Koivulehto, K. y Korkeala, H. (2002). High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 72, pp: 45-52.
- Nevas, M., Lindström, M., Hautamaki, K., Puoskari, S. y Korkeala, H. (2005). Prevalence and diversity of *Clostridium botulinum* types A, B and F in honey produced in the Nordic countries. *International Journal of Food Microbiology*, 105, pp: 145-151.
- Nevas, M., Lindström, M., Hörman, A., Keto-Timonen, R. y Korkeala, H. (2006). Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment. *Environmental Microbiology*, 8, pp: 1085-1094.
- Pellizzari, R., Rossetto, O., Schiavo, G. y Montecucco, C. (1999). Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354, pp: 259-268.
- Pickett, J., Berg, B., Chaplin, E. y Brunstetter-Shafer, M. (1976). Syndrome of *Clostridium botulinum* in infancy: clinical and electrophysiologic study. *New England Journal of Medicine*, 295, pp: 770-772.
- Satorres, S.E., Alcaráz, L.E., Fernández, R. y Puig de Centorbi, O.N. (1999). Isolation of *Clostridium botulinum* in medicinal plants. *Anaerobe*, 5, pp: 173-175.
- SCVMPH (2002). Scientific Committee for Veterinary Measures relating to Public Health. Opinion of the Scientific Committee on measures relating to public health on honey and microbiological hazards. Adopted on 19-20 June 2002.
- Smith, L.A. (2009). Botulism and vaccines for its prevention. *Vaccine*, 27, pp: D33-D39.
- Sobel, J. (2005). Botulism. *Clinical Infectious Diseases*, 41, pp: 1167-1173.
- Sugiyama, H. y Mills, D.C. (1978). Intraintestinal toxin in infant mice challenged intragastrically with *Clostridium botulinum* spores. *Infection and Immunity*, 21, pp: 59-63.
- Tanzi, M.G. y Gabay, M.P. (2002). Association between honey consumption and infant botulism. *Pharmacotherapy*, 22, pp: 1479-1483.
- UE (2007). Reglamento (CE) N° 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *DO L 322* de 7 de diciembre de 2007, pp: 12-29.
- Van der Vorst, M.M.J., Jamal, W., Rotimi, V.O. y Moosa, A. (2006). Infant botulism due to consumption of contaminated commercially prepared honey. *Medical Principles and Practice*, 15, pp: 456-458.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al efecto sobre la población española de la derogación de la normativa nacional sobre límites máximos permitidos para las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en alimentos

Miembros del Comité Científico

Rosaura Farré Rovira, Francisco Martín Bermudo, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Mariano Domingo Álvarez, Antonio Herrera Marteache, Félix Lorente Toledano, M^a Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, M^a Rosa Martínez Larrañaga, Antonio Martínez López, Cristina Nerín de la Puerta, Teresa Ortega Hernández-Agero, Perfecto Paseiro Losada, Catalina Picó Segura, Rosa María Pintó Solé, Antonio Pla Martínez, Daniel Ramón Vidal, Jordi Salas-Salvadó, M^a Carmen Vidal Carou.

Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2011-002

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de mayo de 2011

Grupo de Trabajo

Alberto Cepeda Sáez (Coordinador)
Ana María Cameán Fernández
Antonio Herrera Marteache
M^a Rosa Martínez Larrañaga
Perfecto Paseiro Losada
Pilar Biesas Casamayor (AESAN)

Resumen

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos por varias especies de hongos del género *Aspergillus* que crecen en plantas y alimentos de origen vegetal. De entre todas ellas (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂), destaca desde el punto de vista de la seguridad alimentaria la aflatoxina B₁, tanto por ser la más prevalente en alimentos como la más tóxica para los seres humanos.

La Unión Europea, debido a la toxicidad de estos compuestos y con el fin de garantizar una protección eficaz de la salud pública, ha establecido mediante el Reglamento (CE) N° 1881/2006 contenidos máximos para la aflatoxina B₁ y la suma de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en diversos alimentos, entre los que se incluyen aquellos en los cuales la contaminación por este tipo de toxinas resulta más frecuente y puede resultar más peligrosa para la salud humana.

En España, previamente a lo establecido por el Reglamento (CE) N° 1881/2006, ya se dispone de una norma reguladora, el Real Decreto 475/1988, en el cual se establecen límites máximos permitidos de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en alimentos para consumo humano de 10 mg/kg para la suma de dichas aflatoxinas y de 5 mg/kg para la aflatoxina B₁.

Si bien es cierto que el Reglamento (CE) N° 1881/2006 cubre los alimentos que de manera más habitual pueden representar un riesgo para la salud humana originado por la presencia de aflatoxinas, existen trabajos científicos en los cuales se ha demostrado la presencia tanto de aflatoxinas totales como de aflatoxina B₁ en alimentos no incluidos en el Reglamento (CE) N° 1881/2006 en cantidades superiores a las establecidas como límites en el Real Decreto 475/1988.

Por este motivo, y sin perjuicio de las medidas de gestión que sean pertinentes, el Comité Científico considera que, en este momento y hasta que se disponga de datos representativos de la presencia de aflatoxinas en algunos alimentos no incluidos en la legislación europea tales como la chufa, el Real Decreto 475/1988 que regula los límites máximos permitidos de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ ofrece un

nivel de protección significativo para el consumidor respecto a determinados alimentos no regulados por el Reglamento (CE) N° 1881/2006.

Palabras clave

Aflatoxinas, aflatoxina B₁, aflatoxicosis, alimentos, daño hepático, prevención, residuos, cereales, chufa.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to the effect on the Spanish population of the derogation of national regulation on maximum allowed limits for aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in food.

Abstract

Aflatoxins are toxic metabolites produced by some species of molds belonging to the genus *Aspergillus* which grow on plants and vegetable-origin foods. Among the aflatoxins that can be found (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and M₂), from a food safety point of view the most remarkable is aflatoxin B₁, because it is the most prevalent in foods and toxic for humans.

Due to the toxicity of these substances and to protect consumers' health, the European Union has stated maximum residue limits (MRL) for aflatoxins in foods, in the Commission Regulations (EC) No 1881/2006. MRL have been established for aflatoxin B₁ and the sum of B₁, B₂, G₁ and G₂ in different foods, including those in which contamination with these kind of toxins is more frequent and can be more dangerous for human health.

The Spanish Royal Decree 475/1988, approved before the Commission Regulation (EC) No 1881/2006, sets MRL for the aflatoxins in food for human consumption; 5 mg/kg for aflatoxin B₁ and 10 mg/kg for the sum of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂.

Despite the Commission Regulation (EC) No 1881/2006 includes food which most could usually pose a risk for human health, specific papers have demonstrated the presence of total aflatoxins and aflatoxin B₁ in foods not included in the Commission Regulation (EC) No 1881/2006, even at higher concentrations than those set up by the Spanish Royal Decree 475/1988.

For this reason, notwithstanding the management measures that are pertinent, the scientific committee considers that, while there are no more data about maximum limits for these substances other food samples different than those included in the previously mentioned legislations (as tiger nuts or other doubtful foods regarding their producing conditions) the Royal Decree 475/1988 offers a significant protection for consumers.

Key words

Aflatoxins, aflatoxin B₁, aflatoxicosis, foods, hepatic damage, prevention, residues, cereals, tiger nut.

Introducción

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos por varias especies de hongos del género *Aspergillus* que crecen en plantas y alimentos de origen vegetal. Las principales especies productoras de aflatoxinas son *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, aunque también se han descrito otras especies productoras de aflatoxinas en alimentos tales como *A. nomius* (Kruztman et al., 1987), *A. tamarii* (Goto et al., 1997), *A. pseudotamarii* (Ito et al., 2001) o *A. australis* (IARC, 2002).

Estos compuestos fueron descubiertos a finales de los años 50 y principios de los 60 como consecuencia de la investigación acerca de la alta mortandad originada en aves de corral y otros animales productores de alimentos como consecuencia de la ingestión de pienso que contenía cacahuete procedente de Sudamérica (Blount, 1961) (Sargeant et al., 1961). Se trata de compuestos fluorescentes con una estructura cumarínica condensada con un bifurano y una pentanona (aflatoxinas B) o una lactona (aflatoxinas G). Las letras B y G se refieren a la coloración de las aflatoxinas bajo la luz ultravioleta (en inglés, *Blue*: azul y *Green*: verde) y los números 1 y 2 se refieren a su posición en un desarrollo cromatográfico.

Las aflatoxinas más relevantes en términos de seguridad alimentaria son las aflatoxinas B₁ y B₂ (producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*), G₁ y G₂ (producidas por *A. parasiticus*) y M₁ y M₂ (productos metabólicos de las aflatoxinas B₁ y B₂ que son excretados en leche). De entre todas ellas, destaca desde el punto de vista de la seguridad alimentaria la aflatoxina B₁, tanto por ser la más prevalente en alimentos como la más tóxica para los seres humanos (Deng et al., 2010).

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha evaluado las aflatoxinas B y G en varias ocasiones desde 1987 (JECFA, 1987, 1997, 1999, 2002, 2007) y ha recomendado que, debido a su potencial carcinogénico, la exposición dietética a las aflatoxinas se reduzca al mínimo posible. Igualmente, en 2007, el informe del Panel de Contaminantes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) indicó que la exposición a las aflatoxinas procedentes de todas las fuentes alimentarias debía mantenerse tan baja como fuera razonablemente posible debido a sus propiedades genotóxicas y carcinogénicas (EFSA, 2007).

Recientemente, el *Codex Alimentarius* ha establecido límites máximos para aflatoxinas totales (suma de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂) en frutos con cáscara (almendras, cacahuets, avellanas, pistachos y nueces de Brasil) destinados a una transformación posterior, situándolos en 15 µg/kg con respecto a los 10 µg/kg permitidos para estos mismos productos listos para el consumo basándose en la información proporcionada por JECFA (*Codex Alimentarius*, 2008).

En la Unión Europea, debido a la toxicidad de estos compuestos, y con el fin de garantizar una protección eficaz de la salud pública, el Reglamento (CE) N° 1881/2006 (UE, 2006a) ha establecido contenidos máximos para, entre otros contaminantes, la aflatoxina B₁ y la suma de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en distintos alimentos, incluyendo frutos de cáscara arbóreos, frutos secos, cereales, maíz y arroz, cacahuets y semillas oleaginosas y los productos derivados y transformados de todos ellos, determinadas especias, alimentos elaborados a base de cereales transformados, alimentos para lactantes y niños de corta edad, preparados para lactantes y preparados de continuación y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes (Tabla 2).

De esta forma, los productos especificados en dichas normas que contengan aflatoxinas en niveles que superen los contenidos máximos establecidos no deben comercializarse como tales, ni tras su

mezcla con otros productos alimenticios, ni utilizarse como ingrediente en otros alimentos. Asimismo, este Reglamento considera que, dado que la selección u otros tratamientos físicos permiten reducir el contenido de aflatoxinas de diversos alimentos como cacahuetes y otras semillas oleaginosas, frutos de cáscara, frutos secos, arroz y maíz y con el fin de minimizar las repercusiones sobre el comercio, es conveniente permitir contenidos de aflatoxinas más elevados en los productos que no se destinan al consumo humano directo o como ingrediente de productos alimenticios. En estos casos, los contenidos máximos de aflatoxinas se han establecido teniendo en cuenta la efectividad de los tratamientos mencionados a fin de reducir el contenido de las mismas a niveles inferiores a los contenidos máximos establecidos para los productos destinados al consumo humano directo o a ser utilizados como ingredientes de productos alimenticios.

Por ello, los cacahuetes y otras semillas oleaginosas, los frutos de cáscara arbóreos, las frutas pasas, el arroz y el maíz que incumplan los contenidos máximos de aflatoxinas se pueden comercializar en determinadas condiciones que incluyen, entre otras, que antes de ser destinados al consumo humano directo o a su uso como ingredientes de productos alimenticios sean sometidos a un tratamiento físico que consiga reducir el contenido de aflatoxinas a los niveles máximos permitidos para esos productos tratados.

En este mismo contexto, los Reglamentos (CE) N° 401/2006 (UE, 2006b) y (UE) N° 178/2010 (UE, 2010b) han establecido normas de muestreo y análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios, mientras que el Reglamento (CE) N° 1152/2009 (UE, 2009) ha regulado las condiciones específicas para la importación de dichos productos, debido al riesgo de contaminación por aflatoxinas de determinados productos alimenticios de algunos terceros países.

En España, previamente a la aprobación del Reglamento (CE) N° 1881/2006, el Real Decreto 475/1988 estableció límites máximos permitidos de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en alimentos para consumo humano de 10 µg/kg para la suma de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ y de 5 µg/kg para la aflatoxina B₁. A diferencia del Reglamento (CE) N° 1881/2006, el Real Decreto 475/1988 no especifica alimentos concretos a los que es aplicable, por lo que puede aplicarse a todos los alimentos destinados al consumo humano que no aparecen regulados en la normativa de la Unión Europea.

Ante la existencia de ambas normativas reguladoras de límites máximos permitidos de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en alimentos, cabe preguntarse si la reglamentación nacional cubre aspectos no incluidos en la de la Unión Europea y, por tanto, aporta un cierto nivel de protección del consumidor o si, por el contrario, es redundante y no ofrece mayores niveles de seguridad.

Por ello, la Dirección Ejecutiva de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha planteado al Comité Científico una cuestión en relación al efecto que tendría sobre la población española la derogación de Real Decreto 475/1988 que regula los máximos permitidos para las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en alimentos no regulados por el Reglamento (CE) N° 1881/2006.

Actividad biológica y toxicidad de las aflatoxinas para los seres humanos

Las aflatoxinas B y G son micotoxinas genotóxicas y carcinogénicas (SCF, 1996), habiendo sido clasificadas por la *International Agency for Research on Cancer* dentro del grupo 1 (sustancias carcinogénicas para humanos) (IARC, 1993). También se ha descrito un potencial efecto inmunosupresor

y de interferencia nutricional (Williams et al., 2004) así como efectos mutagénicos, teratogénicos y hepatotóxicos (Kensler et al., 2011). Se considera que la aflatoxina de mayor poder carcinogénico es la aflatoxina B₁ (JECFA, 1999) que, además, es la que se suele encontrar en mayor concentración en alimentos y piensos contaminados (Sweeney y Dobson, 1998).

Los efectos biológicos producidos como respuesta al consumo de aflatoxinas, dependen de la variación entre especies, la edad, el sexo, el estado nutricional, los componentes de los alimentos en los que esten presentes y las interacciones con sustancias químicas. Adicionalmente, la dosis y el período de exposición del organismo a la toxina también son muy importantes. A este respecto debe tenerse en cuenta que aunque los alimentos en los que aparecen con una mayor prevalencia son los alimentos vegetales ya mencionados, las aflatoxinas pueden acumularse en los tejidos de los animales productores de alimentos tras su ingestión y alcanzar al ser humano a través del consumo de alimentos de origen animal en los que se halla presente o por los que se ha excretado como es el caso de la leche (Deng et al., 2010). Sus efectos sobre el organismo están estrechamente relacionados con su estructura química y, de modo genérico, se pueden clasificar como carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, hepatotóxicos e inmunosupresores (Kensler et al., 2011).

Las manifestaciones clínicas de la aflatoxicosis aguda son vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar, así como infiltración grasa y necrosis del hígado (Kensler et al., 2011). No obstante, la aparición de estos cuadros en seres humanos es sumamente escasa y su peligrosidad viene determinada básicamente por su toxicidad crónica. El potencial carcinogénico de las aflatoxinas, fundamentalmente de la aflatoxina B₁, ha sido bien establecido en muchas especies animales, incluyendo roedores (que tienen una alta susceptibilidad a estas sustancias), primates y peces. El hígado es de manera constante el principal órgano afectado por la acción tóxica de la aflatoxina B₁. No obstante, dependiendo de la especie animal y la raza, la dosis, la vía de exposición y la dieta de los sujetos expuestos, también se han documentado tumores relacionados con la acción de las aflatoxinas en otros órganos y lugares del cuerpo tales como los riñones o el colon (Kensler et al., 2011).

Factores que influyen en el desarrollo de *Aspergillus* y en la producción de aflatoxinas

Los factores implicados en el crecimiento de los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* en los alimentos son tanto los propios del medio en el que se desarrollan (pH, composición del alimento o actividad de agua), como factores extrínsecos: humedad ambiental, temperatura de almacenamiento y competencia microbiana (Zinedine y Mañes, 2009). *A. flavus* y *A. parasiticus*, los principales hongos productores de aflatoxinas, tienen patrones similares de crecimiento y toxigenénesis (Tabla 1).

Tabla 1. Límites de crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus*

Crecimiento	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
	Mínimo		Óptimo		Máximo	
Temperatura °C	10-12	12	33	32	43	42
Actividad de agua	0,8	0,80-0,83	0,98	0,99	>0,99	>0,99
pH	2	2	5-8	5-8	>11	>11
Producción de aflatoxinas	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
	Mínimo		Óptimo		Máximo	
Temperatura °C	13	12	16-31	25	31-37	40
Actividad de agua	0,82	0,86-0,87	0,95-0,99	0,95	>0,99	>0,99
pH	-	2	-	6	-	>8

Fuente: (ICMSF, 1996).

Aunque las condiciones descritas varían ligeramente en función de la fuente bibliográfica, algunos autores refieren que *A. flavus* o *A. parasiticus* crecen en un intervalo de temperatura de 10-12 a 42-43 °C y, óptimamente, entre 32 y 33 °C. Pueden crecer en un intervalo de pH amplio (2,1 a 11,2) con un crecimiento óptimo entre 3,5 y 8. En cuanto a la actividad de agua (a_w), los valores mínimos de crecimiento están entre 0,80 y 0,83 y el óptimo en 0,99 (Sweeney y Dobson, 1998).

Por lo que se refiere a la toxigenénesis, el intervalo de temperatura en el que se producen va de 12 a 40 °C, con un óptimo entre 25 y 30 °C. En *A. parasiticus* la proporción de producción de aflatoxinas B respecto a G es mayor a temperaturas altas (ICMSF, 1996). Se producen en un intervalo de pH entre 3,5 y 8, con un óptimo de pH 6 y, en cuanto a la actividad del agua (a_w), el mínimo para la producción es de 0,82 para *A. flavus* (Sweeney y Dobson, 1998) con un óptimo de 0,99 (Cousin et al., 2005).

El clima típico de los países mediterráneos, caracterizado por temperatura y humedad altas, favorece tanto el crecimiento de los hongos como la producción de aflatoxinas por parte de éstos (óptimo entre 25 y 30 °C) (Sweeney y Dobson, 1998). Este tipo de clima podría relacionarse con el hecho de que en alguno de estos países, como es el caso de Marruecos, exista una alta prevalencia de carcinoma hepático, al igual que de otras patologías de etiología desconocida que se cree que pueden estar relacionadas con la ingesta de aflatoxinas (Zinedine y Mañes, 2009).

La producción de aflatoxinas también depende de las fuentes de carbohidratos y nitrógeno, fosfatos, lipoperóxidos y elementos traza (Luchese y Harrigan, 1993). De este modo, esta producción se ve favorecida por un medio rico en carbohidratos, aunque algunos sustratos ricos en grasa y proteína como los cacahuetes también permiten la producción de aflatoxinas (Marth, 1990). En algunos casos, la presencia de otros hongos puede disminuir la síntesis de aflatoxinas (Wicklów et al., 1980) (Tsubouchi et al., 1981) y también algunos componentes de distintos alimentos reducen la producción de aflatoxinas. Así, por ejemplo, la oleuropeína, un compuesto fenólico iridoidico contenido en las aceitunas, disminuye la producción de aflatoxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus*. La cafeína inhibe el crecimiento de *Aspergillus* y la producción de aflatoxinas (CAST, 1998) y lo mismo ocurre, por ejemplo, con los aceites esenciales de orégano y canela (García-Camarillo et al., 2006).

Se ha descrito también que algunas vitaminas, como es el caso de la vitamina K₅, que presentan actividad antimicrobiana, ralentizan tanto el crecimiento de las especies de *Aspergillus* productoras de aflatoxinas, como la producción de aflatoxinas por parte de estos hongos (Miranda et al., 2011).

Es también un hecho conocido que algunas bacterias ácido-lácticas producen compuestos con propiedades antimicrobianas y antimicóticas, y pueden utilizarse para el control del crecimiento de bacterias patógenas, bacterias alterantes y hongos. Las bacterias ácido-lácticas con mayor capacidad de inhibir o reducir el crecimiento de hongos productores de toxinas pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, y, en menor medida, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Dalié et al., 2010). Asimismo, también se ha demostrado que además de la inhibición del crecimiento fúngico, ciertas bacterias ácido-lácticas tienen capacidad para capturar aflatoxinas, reduciendo de este modo su biodisponibilidad. Este proceso es rápido y reversible (Bueno et al., 2006), y es dependiente tanto de la dosis como de la cepa estudiada (Kankaanpää et al., 2000). Estudios realizados recientemente han demostrado que esta capacidad de capturar aflatoxinas (especialmente aflatoxina B₁), se debe a los peptidoglicanos de la pared bacteriana de algunas bacterias ácido-lácticas (Lahtinen et al., 2004). Este mecanismo también se ha observado en otros microorganismos como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Bueno et al., 2006).

Por otra parte, se conoce que ciertas sustancias tienen un efecto inhibitorio de la toxicidad causada por las aflatoxinas, bien sea por activación de su metabolización o por inhibición de sus efectos oxidantes. Un ejemplo puede ser el azafrán (*Crocus sativus*), cuyo extracto acuoso es capaz de prevenir la peroxidación lipídica inducida por diferentes sustancias como las aflatoxinas así como de promover los sistemas enzimáticos destoxicantes y del cual se ha comprobado en pruebas realizadas en ratones que contiene sustancias protectoras contra diversos agentes hepatotóxicos, entre los que se encuentra la aflatoxina B₁ (Premkumar et al., 2003). Por otra parte, se ha comprobado que la administración de cápsulas de té verde gracias a su contenido polifenólico protege frente el daño celular inducido por las aflatoxinas no solo por sus propiedades antioxidantes sino también por activación de su metabolización (Kensler et al., 2011).

Debemos también tener en cuenta que *Aspergillus* es un microorganismo aerobio, por lo tanto el envasado al vacío o en atmósferas modificadas que reducen la disponibilidad de oxígeno inhiben la producción de aflatoxinas (Ellis, 1993).

Presencia de aflatoxinas en alimentos

La contaminación por *Aspergillus* puede producirse en los propios cultivos, como sucede con los cacahuetes y el maíz, algunas veces favorecida por la acción de los insectos, o en el transporte y almacenamiento, como sucede con los cereales (ICMSF, 1996). La toxina puede persistir en el alimento aunque el hongo toxigénico haya desaparecido y, en este sentido, se han detectado aflatoxinas en prácticamente todas las zonas del mundo y en casi todos los alimentos de primera necesidad, en mayor o menor medida. Además, resulta también un factor clave el hecho de que estas toxinas presentan una elevada estabilidad térmica, lo cual favorece que permanezcan en algunos alimentos cocinados y que la congelación no tenga apenas efectos sobre su presencia en los alimentos (Rasch et al., 2010).

Las herramientas más importantes para prevenir y limitar la aparición de aflatoxinas en los alimentos

son las buenas prácticas durante la producción agrícola y el almacenamiento de los alimentos, que debe realizarse a temperaturas y humedades relativas que dificulten tanto el crecimiento fúngico como la producción de aflatoxinas por parte de los hongos potencialmente productores de las mismas. Es también sumamente importante evitar la contaminación cruzada entre lotes diferentes de alimentos. Durante el procesado del alimento puede lograrse el objetivo de reducir la exposición alimentaria a las aflatoxinas mediante la selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios. Por ejemplo, el descascarillado del arroz y la eliminación de la gluma al molerlo, disminuyen el contenido de aflatoxinas, de ahí que el arroz blanco molido tenga un nivel de aflatoxinas menor al arroz sin descascarillar. Asimismo, también se ha demostrado que el cocinado a presión puede reducir hasta en un 83% el contenido en aflatoxinas del arroz crudo (Park y Kim, 2006).

Estos tratamientos reducen el contenido en aflatoxinas y su efectividad se tiene en cuenta a la hora de fijar los contenidos máximos en determinados alimentos (Tabla 2). Por ello, en cacahuets y otras semillas oleaginosas, frutos de cáscara arbóreos, frutas pasas, arroz y maíz que van a someterse a un tratamiento antes de su consumo humano directo, se permiten niveles de aflatoxinas mayores ya que el tratamiento llevará el contenido final a valores inferiores a los contenidos máximos establecidos para estos mismos productos, cuando se destinan al consumo humano directo o a su uso como ingredientes de productos alimenticios.

Asimismo, en el establecimiento de los niveles de aflatoxinas para las semillas oleaginosas y sus productos derivados, se ha tenido en cuenta que el proceso de producción de los aceites vegetales refinados elimina casi por completo las aflatoxinas. Como consecuencia, se han excluido del Reglamento (CE) N° 1881/2006 las semillas oleaginosas, incluidos los cacahuets, que vayan a molerse para la producción de aceite vegetal refinado y el propio aceite vegetal refinado.

El tratamiento con amoníaco reduce el contenido de aflatoxinas en piensos (ICMSF, 1998) y respecto a los tratamientos térmicos, aunque las aflatoxinas son bastante termoestables, algunos estudios han indicado que se puede reducir su contenido en alimentos contaminados mediante un tratamiento térmico superior a 100 °C (ICMSF, 1996). Sin embargo, para eliminarlas por completo debería alcanzarse su punto de fusión, lo cual es inaceptable en el procesado de los alimentos (Marth, 1990).

Los alimentos más susceptibles a la contaminación por aflatoxinas y que pueden implicar una mayor exposición están incluidos en el Reglamento (CE) N° 1881/2006 (maíz, arroz, cereales en general, avellanas, almendras, nueces de Brasil, pistachos, cacahuets y otras semillas oleaginosas, frutas secas como higos o pasas y especias como el pimentón, nuez moscada, jengibre o cúrcuma). Para ellos se han establecido límites máximos (Tabla 2).

Tabla 2. Contenidos máximos permitidos de aflatoxinas B y G en productos alimenticios ($\mu\text{g}/\text{kg}$) según el Reglamento (CE) N° 1881/2006

Contenidos máximos de aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
Apartado	Productos alimenticios	B ₁	Suma de B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂
2.1.1	Cacahuets y otras semillas oleaginosas que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios, con la excepción de: los cacahuets y otras semillas oleaginosas que vayan a molerse para la producción de aceite vegetal refinado.	8,0	15,0
2.1.2	Almendras, pistachos y huesos de albaricoque que vayan a someterse a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	12,0	15,0
2.1.3	Avellanas y nueces del Brasil que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	8,0	15,0
2.1.4	Frutos de cáscara arbóreos, salvo los indicados en los puntos 2.1.2 y 2.1.3, que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	5,0	10,0
2.1.5	Cacahuets y otras semillas oleaginosas y sus productos transformados destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes en los productos alimenticios, con la excepción de: –aceites vegetales crudos destinados a ser refinados –aceites vegetales refinados.	2,0	4,0
2.1.6	Almendras, pistachos y huesos de albaricoque destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios.	8,0	10,0
2.1.7	Avellanas y nueces del Brasil destinadas al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios.	5,0	10,0
2.1.8	Frutos de cáscara arbóreos, distintos de los indicados en los puntos 2.1.6 y 2.1.7, y sus productos transformados destinados al consumo humano directo o a utilizarse como ingredientes de productos alimenticios.	2,0	4,0
2.1.9	Frutas pasas que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	5,0	10,0
2.1.10	Frutas pasas y sus productos transformados para el consumo humano directo o su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	2,0	4,0
2.1.11	Todos los cereales y todos los productos a base de cereales, uncluidos los productos de cereales transformados, salvo los productos alimenticios indicados en los puntos 2.1.12, 2.1.15 y 2.1.17.	2,0	4,0
2.1.12	Maíz y arroz que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	5,0	10,0
2.1.14	Los siguientes tipos de especias: <i>Capsicum</i> spp. (frutas pasas de dicho género, enteras o molidas, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón); <i>Piper</i> spp. (frutos de dicho género, con inclusión de la pimienta blanca y negra); <i>Myristica fragrans</i> (nuez moscada); <i>Zingiber officinale</i> (jengibre); <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma); mezclas de especias que contengan una o varias de estas especias.	5,0	10,0
2.1.15	Alimentos a base de cereales transformados y alimentos para lactantes y niños de corta edad.	0,10	–
2.1.17	Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes.	0,10	–

Junto a estos alimentos se ha descrito la presencia de aflatoxinas en otros productos alimenticios, incluyendo productos de origen animal como hígado (Mahmoud et al., 2001), hamburguesas y otros productos cárnicos procesados, probablemente a través de la adición de especias (Aziz y Youssef, 1991). También se ha encontrado presencia de aflatoxinas en carne de aves de corral (Bintvihok et al., 2002) (Hussain et al., 2010), pescado procedente de la acuicultura como la tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) (Deng et al., 2010) o la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) (El-Sayed y Khalil, 2009) o la leche (Zinedine y Mañes, 2009). En el caso de este último alimento la presencia de aflatoxinas B y G es mucho menos relevante que la presencia de la aflatoxina M₁, metabolito de la aflatoxina B₁ (Ayar et al., 2007).

La contaminación de los alimentos de origen animal se produce a través de la alimentación de los animales productores de alimentos (Rasch et al., 2010). En el caso del pescado procedente de la acuicultura, la presencia de este tipo de toxinas ha ido incrementándose en los últimos años, debido al creciente uso de piensos y harinas vegetales para la alimentación de estos peces (Deng et al., 2010), aunque a día de hoy los datos disponibles en la bibliografía científica proceden básicamente de estudios experimentales y no de estudios de mercado. Es importante señalar que tanto en el caso de los peces como en los mamíferos, estas toxinas se acumulan fundamentalmente en el hígado (Deng et al., 2010), por lo que es en este tejido donde se encontrará una mayor concentración de aflatoxinas en caso de que el animal haya estado expuesto. La eliminación de este órgano para el consumo humano a través de la evisceración reduce de una manera muy importante el riesgo derivado de la ingesta de aflatoxinas por consumo de estos alimentos.

Experimentos llevados a cabo en diversas aves de corral demostraron que una alimentación contaminada con aflatoxina B₁ (3 mg/kg) provocaba concentraciones superiores a 7 µg/kg en hígado y 0,38 µg/kg en carne de codornices que la habían consumido (Bintvihok et al., 2002). En otro ensayo, Hussain et al. (2010), determinaron que alimentando pollos durante siete días con un pienso contaminado con 6,4 mg/kg de aflatoxina B₁, se alcanzaban concentraciones de aflatoxina B₁ cercanas a 7 µg/kg en hígado y superiores a 3 µg/kg en músculo, si bien estas concentraciones descienden hasta valores indetectables en pocos días tras cesar la alimentación con pienso contaminado.

En el caso de los pescados procedentes de la acuicultura, Deng et al. (2010) comprobaron que alimentando tilapias con pienso contaminado con varias dosis de aflatoxina B₁, éstas alcanzaron concentraciones hepáticas de hasta 40 µg/kg de aflatoxina B₁ sin que aumentase su mortalidad. Por otra parte, otro trabajo demostró que, aunque se mostraron síntomas evidentes de enfermedad en los animales sometidos a ensayo, una contaminación de 18 mg/kg de aflatoxina B₁ en el pienso de lubinas (*Dicentrarchus labrax* L.) durante períodos prolongados de tiempo provocaba la aparición de residuos de esta toxina en músculo del pescado en valores cercanos a los 5 µg/kg, al tiempo que aparecían síntomas evidentes de enfermedad en los animales sometidos a ensayo (El-Sayed y Khalil, 2009).

También se ha encontrado contaminación por aflatoxinas en productos de origen vegetal diferentes de los incluidos en el Reglamento (CE) Nº 1881/2006, los cuales se muestran en la Tabla 3. Si bien en el caso de algunos alimentos como las especias la exposición potencial a aflatoxinas vehiculadas por estos alimentos es pequeña debido a su consumo reducido, en otros casos como el café o los garbanzos, su ingesta sí podría llegar a ser un riesgo potencial teniendo en cuenta las concentraciones de aflatoxinas encontradas por algunos autores.

Tabla 3. Ejemplos de alimentos no incluidos en el Reglamento (CE) N° 1881/2006 en los que se han encontrado concentraciones de aflatoxina B₁ o aflatoxinas totales superiores a las establecidas como límite en el Real Decreto 475/1988

Alimento	Contenido máximo detectado (µg/kg)	Tipo	Fuente
Garbanzos	205	Aflatoxina B ₁	(Ahmad y Singh, 1991)
Hierbas aromáticas y especias variadas	35	Aflatoxina B ₁	(El-Kady et al., 1995)
Paprika	20	Aflatoxina B ₁	(Martins et al., 2001)
Café tostado	16	Aflatoxinas totales	(Soliman, 2002)
Café descafeinado	24	Aflatoxinas totales	(Soliman, 2002)
Raíz de ginseng	16	Aflatoxinas totales	(D'Ovidio et al., 2006)

En bebidas alcohólicas, tales como vino y cerveza, también puede encontrarse de manera ocasional la aflatoxina B₁. En el caso del vino, esta toxina puede hallarse más frecuentemente en el tinto, seguido del rosado y finalmente en el blanco (Rasch et al., 2010). No obstante, la principal micotoxina presente en las bebidas alcohólicas es la ocratoxina A (Mateo et al., 2007), no alcanzando las aflatoxinas de los grupos B y G niveles elevados.

En relación a las chufas (*Cyperus esculentus*), en 1999, en respuesta a una pregunta en el Parlamento Europeo, la Comisión Europea alegaba que no se habían fijado límites máximos en este producto porque no disponía de datos de contaminación por aflatoxinas en el mismo (Parlamento, 1999). Posteriormente, en 2002 se realizaron tres notificaciones en la Unión Europea sobre chufas importadas contaminadas por aflatoxinas (SCIRI, 2002) y en abril de 2004, se efectuó una notificación sobre chufa importada de Mali con un nivel de contaminación de 300 µg/kg de aflatoxina B₁ (RASFF, 2004). Se han detectado aflatoxinas en chufa almacenada durante 150 días, con un nivel medio de 454 µg/kg de aflatoxina B₁ y 80 µg/kg de aflatoxina G₁ (Adebajo, 1993). En lo referente a la horchata, se han publicado varios trabajos científicos en los cuales se señala la presencia de aflatoxina B₁ en horchatas comercializadas en España (Arranz et al., 2006) (Rubert et al., 2011). En ambos trabajos se describe una pequeña proporción de horchatas contaminadas y además con un bajo índice de contaminación, inferior a 2 µg/kg.

Modificaciones recientes en la legislación referente a la contaminación por aflatoxinas de los alimentos

Los hallazgos y los cambios que se van produciendo en el campo de la alimentación hacen necesario replantear las políticas alimentarias. En el caso que nos ocupa, tanto la introducción en la alimentación de alimentos procedentes de otros países, hasta ahora no habituales en nuestra dieta como las modificaciones en las condiciones ambientales, pueden determinar cambios en el desarrollo fúngico o en la producción de micotoxinas. En este sentido, recientemente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha iniciado el proceso para estudiar el potencial incremento de la presencia de aflatoxina B₁ en cereales como consecuencia del cambio climático utilizando modelos predictivos que indiquen una potencial contaminación emergente de los alimentos debida a micotoxinas (EFSA, 2009).

Asimismo, en 2007, el panel de contaminantes de EFSA (CONTAM) en relación a una pregunta sobre el incremento potencial del riesgo para la salud de los consumidores que supondría un posible aumento de los límites máximos de aflatoxinas existentes en almendras, avellanas y pistachos, indicó que el aumento del contenido máximo de aflatoxinas totales de 4 a 8 ó 10 µg/kg en estos alimentos, tendría un efecto mínimo en las estimaciones sobre la exposición alimentaria, el riesgo de cáncer y los intervalos de exposición calculados. Este criterio se ha tenido en cuenta en el Reglamento (CE) N° 165/2010 (UE, 2010a) que modificó los límites establecidos inicialmente en el Reglamento (CE) N° 1881/2006.

Conclusiones del Comité Científico

Vista toda la información expuesta anteriormente, es un hecho comprobado que los contenidos máximos de aflatoxinas B y G en los alimentos que de manera más frecuente pueden ser portadores de este tipo de aflatoxinas quedan expresamente regulados por el Reglamento (CE) N° 1881/2006.

No obstante, hay varios hechos que el Comité Científico considera deben ser tenidos en cuenta para una correcta protección del consumidor frente a la exposición a estos agentes tóxicos:

- Existen otros alimentos de origen vegetal en los cuales estas toxinas han sido detectadas en cantidades similares o superiores (Tabla 3) a los límites establecidos en el Real Decreto 475/1988, tales como el café, los garbanzos, la raíz de ginseng o una cierta variedad de hierbas aromáticas y especias.
- En estudios experimentales se demuestra que estas toxinas pueden acumularse en diversos tejidos de animales productores de alimentos, tales como el hígado y músculo de aves de corral o de pescado cultivado, encontrándose en ocasiones y en algunos tejidos, niveles de contaminación superiores o similares a los establecidos en el Real Decreto 475/1988. Aunque el pescado cultivado suele consumirse eviscerado, si es habitual encontrar en los mercados hígados de ave de corral destinados al consumo humano.
- No se debe tampoco obviar que la chufa, no incluida en el Reglamento (CE) N° 1881/2006, además de ser una materia prima para la elaboración de horchata, se consume directamente. En los últimos años se han encontrado en algunos casos, concentraciones muy elevadas (en uno de ellos alcanzó los 300 µg/kg) de aflatoxinas en partidas de chufas importadas de diversos países africanos. En el caso de la horchata, los niveles encontrados son inferiores a los límites establecidos en el Real Decreto 475/1988, por lo que con los datos disponibles a día de hoy este alimento no representaría un riesgo significativo para la población.
- Es también un hecho que debido a la globalización y la intensa inmigración que ha experimentado nuestro país en los últimos años, es cada vez más frecuente encontrar en nuestros mercados productos alimenticios que no habituales en nuestra alimentación. Algunos de estos alimentos podrían ser susceptibles de contener aflatoxinas, no figurando en el Reglamento (CE) N° 1881/2006, por lo que sería conveniente disponer de más estudios de contenido de aflatoxinas en determinados alimentos no incluidos en el Reglamento (CE) N° 1881/2006 como la chufa o especies de pescado cultivado en los que hay indicios de que puedan estar presentes estas micotoxinas y remarcar la utilidad de los controles de aflatoxinas en piensos para evitar la contaminación de los productos de origen animal.

Por todos estos motivos, y sin perjuicio de las medidas de gestión que sean pertinentes, el Comité Científico considera que, en este momento y hasta que se disponga de datos representativos de presencia de aflatoxinas en alimentos tales como los citados anteriormente u otros de los que no se tenga seguridad respecto de sus condiciones de producción, el Real Decreto 475/1988 que regula los límites máximos permitidos de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ ofrece un nivel de protección significativo para el consumidor respecto a determinados alimentos no regulados por el Reglamento (CE) N° 1881/2006.

Referencias

- Adebajo, L.O. (1993). Survey of aflatoxins and ochratoxin A in stored tubers of *Cyperus esculantus* L. *Appelgren LE, Arora RG. Mycopathology*, 124 (1), pp: 41-46.
- Ahmad, S.K. y Singh, P.L. (1991). Mycofloral changes and aflatoxin contamination in stored chickpea seeds. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 8 (6), pp: 723-730.
- Arranz, I., Stroka, J. y Neugebauer, M. (2006). Determination of aflatoxin B₁ in tiger nut-based soft drinks. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 23 (3), pp: 305-308.
- Ayar, A., Sert, D. y Çon, A.H. (2007). A study on the occurrence of aflatoxin in raw milk due to feeds. *Journal of Food Safety*, 27, pp: 199-207.
- Aziz, N.H. y Youssef, Y.A. (1991). Occurrence of aflatoxins and aflatoxin-producing moulds in fresh and processed meat in Egypt. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 8 (3), pp: 321-331.
- Bintvihok, A., Thiengnin, S., Doi, K. y Kumagai, S. (2002). Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. *Journal of Veterinary Medical Sciences*, 64, pp: 1037-1039.
- Blount, W.P. (1961). Turkey "x" disease. *Journal of British Turkey Federation*, 9, pp: 55-58.
- Bueno, D.J., Casale, C.H., Pizzolitto, R.P., Salano, M.A. y Olivier, G. (2006). Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model. *Journal of Food Protection*, 70, pp: 2148-2154.
- CAST (1998). Council for Agricultural Science and Technology. Antimicrobial Plant substances. Naturally occurring antimicrobial in food. Task force report, 132. April 1998, pp: 35-40.
- Codex Alimentarius (2008). Codex General Standard for contaminants and toxins in food and feed. Codex Stan 193-1995. pp: 9. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS_193e.pdf [acceso: 5-4-2011].
- Cousin, M.A., Riley, R.T. y Pestka, J.J. (2005). Capítulo 10: Foodborne micotoxinas: Chemistry, biology, Ecology and Toxicology. En libro: *Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology*. Ed. Fratamico, P.M., Bhunia, A.K. y Caister J. L. S. Academic Press, pp: 163-273.
- Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M. y Richard-Forget, F.R. (2010). Lactic acid bacteria-potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21, pp: 370-380.
- Deng, S.X., Tian, L.X., Liu, F.J., Jin, S.J., Liang, G.Y., Yang, H.J., Du, Z.J. y Liu, Y.J. (2010). Toxic effects and residue of aflatoxin B₁ in Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) during long-term dietary exposure. *Aquaculture*, 307, pp: 233-240.
- D'Ovidio, K., Trucksess, M., Weaver C., Horn, E., McIntosh, M. y Bean, G. (2006). Aflatoxins in ginseng roots. *Food Additives & Contaminants*, 23 (2), pp: 174-180.
- EFSA (2007). The European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. Question number: EFSA-Q-2006-174. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/446.htm> [acceso: 6-4-2011].
- EFSA (2009). Modelling, predicting and mapping the (re)emergence of aflatoxin B₁ in cereals in the EU due to climate change. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/art36grants/article36/1211902566559.htm> [acceso: 5-4-2011].

- El-Kady, I.A., El-Maraghy, S.S.M. y Mustafa M.E (1995). Natural occurrence of mycotoxins in different spices. *Folia Microbiologica*, 40, pp: 297-300.
- Ellis, W.O, Smith, J.P., Simpson, B.K., Khanizadehy, S. y Oldham, J.H. (1993). Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. *Food Microbiology*, 10 (1), pp: 9-21.
- El-Sayed, Y.S. y Khalil, R.H. (2009). Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B₁ in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Food and Chemical Toxicology*, 47, pp: 1606-1609.
- García-Camarillo, E.A., Quezada-Viay, M.Y., Moreno-Lara, J. y Sánchez-Hernández, G. (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. *Revista Mexicana de Fitopatología A.C.*, 24 (001), pp: 8-12.
- Goto, T., Ito, Y., Peterson, S.W. y Wicklow, D. (1997). Mycotoxin producing ability of *Aspergillus tamarri*. *Mycotoxins*, 44, pp: 17-20.
- Hussain, Z., Khan, M.Z., Khan, A., Javed, I., Saleemi, M.K., Mahnood, S. y Asi, M.R. (2010). Residues in aflatoxin B₁ in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B₁ levels. *Food and Chemical Toxicology*, 48, pp: 3304-3307.
- IARC (1993). International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs, 56, pp: 362. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56-14.pdf>. [acceso: 5-4-2011].
- IARC (2002). International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins. Disponible en: www.inchem.org/documents/iarc/vol82/82-04.html [acceso: 5-4-2011]
- ICMSF (1996). International Commission on Microbiological Specifications for Food. Toxigenic fungi: *Aspergillus. Microorganism in foods*, 5, pp: 347-381. Characteristics of Food Pathogens. Academic Press, London.
- ICMSF (1998). International Commission on Microbiological Specifications for Food. *Microorganisms in foods*, 6, pp: 348. Microbial Ecology of Food Commodities. Aspen Publishers, INC, Gaithersburg, Maryland.
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D. y Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamarri*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *flavi*. *Mycology Research*, 105, pp: 233-239.
- JECEFA (1987). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Thirty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, N° 759 and Corrigendum.
- JECEFA (1997). Forty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 868.
- JECEFA (1999). Forty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, N° 884.
- JECEFA (2002). Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 906.
- JECEFA (2007). Sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 947.
- Kankaanpää, P., Tuomola, E., El-Nezami, H., Ahokas, J. y Salminen, S.J. (2000). Binding of aflatoxin B₁ alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in Caco-2 model. *Journal of Food Protection*, 63, pp: 412-414.
- Kensler, T.W., Roebuck, B.D., Wogan, G.N. y Groopman, J.D. (2011). Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences*, 120 (S1), pp: S28-S48.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. y Hesselstine, C.W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarri*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 53 (3), pp: 147-58.
- Lahtinen, S.J., Haskard, C.A., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. y Ahokas, J.T. (2004). Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives and Contaminants*, 21, pp: 158-164.
- Luchese, R.H. y Harrigan, W. (1993). Biosynthesis of aflatoxin-the role of nutritional factors. *Journal of Applied Microbiology*, 74, pp: 5-14.
- Mahmoud, A.L.E., Sayed, A.M. y Abou-El-Alla, A.A. (2001). Mycoflora and natural occurrence of mycotoxins in some meat products and livers of poultry and imported bulls. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4 (5), pp: 611-613.

- Marth, E.H. (1990). Mycotoxin. En libro: *Foodborne diseases*. Ed. Cliver, E. O. Academic Press, pp: 137-158.
- Mateo, R., Medina, A., Mateo, E.M., Mateo, F. y Jiménez, M. (2007). An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119, pp: 79-83.
- Martins, M.L., Martins, H.M. y Bernardo F. (2001). Aflatoxins in spices marketed in Portugal. *Food Additives and Contaminants*, 18 (4), pp: 315-9.
- Miranda, J.M., Jorge, F., Dominguez, L., Cepeda, A. y Franco, C.M. (2011). In vitro growth inhibition of food-borne pathogens and food spoilage microorganism by vitamin K₅. *Food and Bioprocess Technology*, 4, pp: 1060-1065.
- Park, J.W. y Kim, Y.B. (2006). Effect of pressure cooking on aflatoxin B₁ in Rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp: 2431-2435.
- Parlamento. (1999). Pregunta escrita E-0630/99 de Encarnación Redondo Martínez a la Comisión. DO L 370 de 21 de diciembre de 1999, pp: 78-79.
- Premkumar, K., Abraham, S.K., Santhiya, S.T. y Ramesh, A. (2003). Protective effects of saffron (*Crocus sativus* L.) on genotoxins-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Phytotherapy Research*, 17 (6), pp: 614-617.
- RASFF (2004). Rapid Alert System for Food and Feed. Annual report of the functioning of the RASFF 2004. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2004_en.pdf. [acceso: 16-5-2011].
- Rasch, C., Böttcher, M. y Kumke, M. (2010). Determination of aflatoxin B₁ in alcoholic beverages: comparison of one- and two-photon-induced fluorescence. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, pp: 87-92.
- Real Decreto 475/1988 de 13 de mayo de 1988 por el que se establecen los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en alimentos para consumo humano. BOE 121 de 20 de mayo de 1988, pp: 15329.
- Rubert, J., Sebastià, N., Soriano, J.M., Soler, C. y Mañes, J. (2011). One-year monitoring of aflatoxins and ochratoxin A in tiger-nuts and their beverages. *Food Chemistry*, 127, pp: 822-826.
- Sargeant, K., O'Kelly, J., Carnaghan, R.B.A. y Allcroft, R. (1961). The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Veterinary Record*, 73, pp: 1219.
- SCF (1996). Scientific Committee on Food. Opinion on Aflatoxins, Ochratoxin A and Patulin. Reports of the Scientific Committee on Food, 35^o Series. European Commission, DG Industry.
- SCIRI (2002). Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información. Colección de Informes Técnicos. Disponible en: http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/memoria/memoria_sciri.pdf [acceso 16-5-2011].
- Soliman, K.M. (2002). Incidence, level, and behaviour of aflatoxins during coffee bean roasting and decaffeination. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 50 (25), pp: 7477-7481.
- Sweeney, M.J. y Dobson, A.D.W. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43, pp: 141-158.
- Tsubouchi H., Yakamoto, K., Hisada, K., Sakabe, Y. y Tsuchihira, K. (1981). Inhibitory effects of nonaflatoxigenic fungi on aflatoxin production by *A. flavus*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 22, pp: 103-111.
- UE (2006a). Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DO L 364 de 20 de diciembre de 2006, pp: 5-24.
- UE (2006b). Reglamento (CE) N° 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. DO L 70 de 9 de marzo de 2006, pp: 12-34.
- UE (2009). Reglamento (CE) N° 1152/2009 de la Comisión de 27 de noviembre de 2009 por el que se establecen condiciones específicas para la importación de determinados productos alimenticios de algunos terceros países debido al riesgo de contaminación de dichos productos por aflatoxinas y se deroga la Decisión 2006/504/CE. DO L 313 de 28 de noviembre de 2009, pp: 40-49.
- UE (2010a). Reglamento (EU) N° 165/2010 de la Comisión de 26 de febrero de 2010 que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DO L 50 de 27 de febrero de 2010, pp: 8-12.

UE (2010b). Reglamento (CE) N° 178/2010 de la Comisión de 2 de marzo de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 401/2006 en lo que respecta a los cacahuets y otras semillas oleaginosas, a los frutos de cáscara arbóreos, a los huesos de albaricoque, al regaliz y al aceite vegetal. DO L 52 de 3 de marzo de 2010, pp: 32-34.

Wicklow, D.T., Hesseltine C.W., Shotwell, O.L. y Adams G.L. (1980). Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology*, 70, pp: 761-764.

Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M. y Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (5), pp: 1106-1122.

Zinedine, A. y Mañes, J. (2009). Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control*, 20, pp: 334-344.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios

Miembros del Comité Científico

Rosaura Farré Rovira, Francisco Martín Bermudo, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Mariano Domingo Álvarez, Antonio Herrera Marteache, Félix Lorente Toledano, M^a Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, M^a Rosa Martínez Larrañaga, Antonio Martínez López, Cristina Nerín de la Puerta, Teresa Ortega Hernández-Agero, Perfecto Paseiro Losada, Catalina Picó Segura, Rosa María Pintó Solé, Antonio Pla Martínez, Daniel Ramón Vidal, Jordi Salas-Salvadó, M^a Carmen Vidal Carou.

Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2011-003

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de mayo de 2011

Grupo de Trabajo

Antonio Martínez López (Coordinador)
Alberto Cepeda Sáez
Antonio Herrera Marteache
Cristina Alonso Andicoberry (AESAN)

Resumen

El Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios establece que, en alimentos listos para el consumo (LPC) que pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, el límite para este microorganismo es de ausencia en 25 g. Únicamente se establece un límite de 100 ufc/g en alimentos LPC no destinados a lactantes o a usos médicos especiales si el fabricante puede demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que no se superará este límite durante toda la vida útil del producto.

Cuando sea necesario, las industrias responsables de la fabricación del producto realizarán estudios conforme a lo dispuesto en el anexo II del Reglamento, especialmente en los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria. La evidencia de que no se supera el límite de 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes* para cada producto a lo largo de su periodo de uso se debe basar en estudios de vida útil, que consistirán inicialmente en la información sobre la composición específica del alimento en cuestión (características intrínsecas y extrínsecas) y comparación con datos procedentes de la literatura científica relevante relativa a las características de crecimiento y supervivencia del microorganismo patógeno en cuestión. El histórico de datos de productos fabricados, la microbiología predictiva y los estudios de vida útil específicos en laboratorio (estudios de durabilidad y ensayos de desafío) son herramientas adicionales que se utilizarán en caso de que los estudios de composición del alimento y condiciones de proceso y comparación con datos publicados en revistas científicas proporcionen dudas respecto a la posibilidad de crecimiento de *Listeria monocytogenes*. No obstante, los ensayos de desafío de alimentos deben evitarse siempre que sea posible y usarse con gran cautela. Se recomienda la consulta con una entidad competente antes de su uso. Se recomienda que la industria sólo realice ensayos de desafío si tiene los medios apropiados, conocimiento, entrenamiento

y experiencia con estas técnicas microbiológicas. En este documento se dan pautas para la aplicación de lo dispuesto en el anexo II del Reglamento (búsqueda de información y estudios complementarios que permitan establecer la vida útil de los alimentos), de forma que ayude al fabricante a escoger la mejor manera de determinar la vida útil de los alimentos que produce y a las autoridades competentes a verificar, cuando sea oportuno, que el fabricante del producto demuestra que no superará el límite de 100 ufc/g durante la vida útil del producto.

Palabras clave

Listeria monocytogenes, vida útil, estudios de desafío, estudios de durabilidad, alimentos listos para su consumo.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to the shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in certain foodstuffs.

Abstract

Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs establishes that, in ready-to-eat foods that may enhance the growth of *Listeria monocytogenes*, the limit for this microorganism is absence in 25 g. A limit of 100 ufc/g is established solely in ready-to-eat foods not intended for infants or for special medical purposes, provided that the manufacturer is able to demonstrate to the satisfaction of the competent authority, that this limit will not be exceeded throughout the entire shelf-life of the product.

Where necessary, the industries responsible for the manufacture of the product shall carry out studies in accordance with that established in annex II of the Regulation, especially in ready-to-eat food that may permit the development of *Listeria monocytogenes* and could suppose a risk to public health with respect to said bacteria. Evidence that the limit of 100 ufc/g of *Listeria monocytogenes* for each product is not exceeded throughout the product's shelf-life, initially consists in the information about the specific composition of the foodstuff in question (intrinsic and extrinsic characteristics) and comparison with data taken from relevant scientific literature relating to the characteristics of growth and survival of the pathogenic microorganism in question. The historical data of the manufactured products, the predictive microbiology and the specific shelf-life studies in the laboratory (durability studies and challenge tests) are additional tools used in the event that the studies of the food composition and processing conditions and comparison of data published in scientific journals offer doubts as to the growth possibilities of *Listeria monocytogenes*. However, food challenge tests should always be avoided wherever possible and used with great caution. We recommend consultation with a competent body prior to use. The industry should only perform challenge tests if they possess the appropriate means, knowledge, training and experience in these microbiological techniques. This document offers guidelines on the application of that established in annex II of the Regulation (search for information and complementary studies that permit the definition of the shelf-life of foodstuffs), in order to assist the manufacturer in selecting the best way of determining the shelf-life of the foods

they produce, and the competent authorities to check, as appropriate, that the product manufacturer proves that the limit of 100 ufc/g is not exceeded during the product's shelf-life.

Key words

Listeria monocytogenes, shelf-life, challenge test, durability studies, ready to eat foods.

Introducción

Listeria monocytogenes es un microorganismo que se ha convertido en uno de los principales agentes patógenos transmitidos por los alimentos listos para su consumo (LPC) que afectan a poblaciones de riesgo. La *Listeria monocytogenes* tiene características únicas y específicas (FSAI, 2005b) (Luber et al., 2011). Se desarrolla adecuadamente a temperaturas de refrigeración con un mínimo entre 1,5 y 3 °C y un máximo de 45 °C, esta capacidad le permite mantener la viabilidad en el interior o en las superficies de los alimentos que generalmente se conservan a bajas temperaturas. Se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente, es altamente contaminante en las plantas procesadoras de alimentos, llegando a contaminar las superficies de contacto de los alimentos incluido el producto mismo. Esta bacteria puede ingresar a las plantas de alimentos mediante la tierra proveniente de los zapatos y la vestimenta del personal que trabaja en la fábrica, así como en el transporte utilizado, por medio de animales que excreten la bacteria o que tengan la piel contaminada y mediante vegetales crudos contaminados. Todo ello hace que la *Listeria monocytogenes* sea un problema importante en la producción de alimentos. Esto es especialmente cierto en el caso de los alimentos listos para su consumo (alimento para el consumo humano directo sin la necesidad de cocinar u otro proceso eficaz para eliminar o reducir la concentración de un microorganismo de interés en salud pública a un nivel aceptable) (LPC) en los que la *Listeria monocytogenes* puede crecer y que no van a recibir un tratamiento térmico durante la producción y para aquellos alimentos que se pueden contaminar a través del medio ambiente industrial (UE, 2008).

Es crucial que los productores de alimentos listos para su consumo lleven a cabo las acciones oportunas para controlar la contaminación por *Listeria monocytogenes*, así como su crecimiento en el producto hasta el fin de su vida útil. Se necesita por tanto disponer de información y documentación sobre el crecimiento potencial en un alimento y debe tenerse en cuenta cuando el productor calcula el tiempo de vida útil para el producto (UE, 2008).

El 15 de noviembre de 2005, la Comisión Europea publicó el Reglamento (CE) N° 2073/2005 (UE, 2005), relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, entre los que se encuentran los alimentos listos para su consumo y *Listeria monocytogenes*.

El artículo 3 del citado Reglamento indica que los explotadores de las empresas alimentarias velarán por que los productos alimenticios cumplan con los límites de los criterios microbiológicos pertinentes establecidos en el mismo Reglamento. Además, el artículo 3 se refiere a los estudios (relacionados en el anexo II del Reglamento) que el explotador de la empresa alimentaria puede llevar a cabo, cuando sea necesario, con objeto de investigar si se cumple con el criterio a lo largo de la vida útil. En particular, esto se aplica a los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria.

En 2008, se difundió el informe SANCO/1628/2008 ver. 9.3 (26112008) (UE, 2008) que es una guía sobre estudios de vida útil en alimentos listos para su consumo en relación a la presencia de *Listeria monocytogenes*, bajo el Reglamento (CE) N° 2073/2005, de 15 de noviembre de 2005, sobre criterios microbiológicos en alimentos y dirigida a los operadores económicos de las industrias alimentarias. No obstante este documento, no describe con detalle la forma de llevar a cabo un estudio de vida útil para un alimento en particular e indica que puede complementarse con directrices más detalladas

realizadas por institutos, autoridades nacionales y la industria alimentaria. Como consecuencia, el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para *Listeria monocytogenes* preparó un documento técnico separado dirigido a los laboratorios que llevan a cabo estudios de vida útil, especialmente estudios de durabilidad y test de desafío (AFSSA, 2008).

Igualmente algunas asociaciones sectoriales de industrias alimentarias (*Chilled Food Association Ltd*) o Agencias de Seguridad Alimentaria (*Food Safety Authority of Ireland*) han preparado documentos o guías dirigidas a las industrias como ayuda para llevar a cabo esos estudios de vida útil en alimentos listos para su consumo (LPC) para *Listeria monocytogenes*, ya que al parecer hay una cierta confusión en los distintos sectores industriales en relación a cómo se deben llevar a cabo estos estudios para sus propios productos de forma que los resultados de los mismos tengan la base científica y estadística necesaria para que sean aceptados por las autoridades sanitarias.

Para clarificar la situación se solicita un informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los modelos aplicables a los estudios de vida útil en alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de *Listeria monocytogenes*.

Términos de referencia: Se requiere que el Comité Científico lleve a cabo una valoración y comparación de los modelos aplicables a los estudios de vida útil de alimentos listos para el consumo que puedan favorecer el desarrollo de *Listeria monocytogenes*.

Este informe ayudaría a los productores a diseñar los estudios de vida útil de sus productos y podría constituir una guía de apoyo para las autoridades competentes que, de forma voluntaria, quieran hacer uso de este documento para valorar, cuando proceda, el cumplimiento de los criterios microbiológicos establecidos para *Listeria monocytogenes* en el Reglamento (CE) N° 2073/2005.

Reglamento

El artículo 3, apartado 2 del Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, establece que, cuando sea necesario, los explotadores de las empresas alimentarias responsables de la fabricación del producto realizarán estudios conforme a lo dispuesto en el anexo II para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil del alimento en cuestión. Esto es aplicable especialmente a los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria. Las empresas alimentarias podrán colaborar en la realización de dichos estudios.

Los estudios a los que se refiere el artículo 3, apartado 2, consistirán en lo siguiente:

- especificaciones de las características fisicoquímicas del producto, como pH, a_w , contenido de sal, concentración de conservantes y tipo de sistema de envasado, teniendo en cuenta las condiciones de almacenamiento y transformación, las posibilidades de contaminación y la vida útil prevista, y
- la consulta de la bibliografía científica y de los datos de investigación disponibles acerca de los aspectos que caracterizan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos en cuestión en relación a dichas características.

Cuando sea necesario, basándose en los estudios antes mencionados, el explotador de la empresa alimentaria realizará estudios complementarios, entre los que pueden incluirse los siguientes:

- elaboración de modelos matemáticos de pronóstico establecidos para el alimento de que se trate, utilizando factores críticos de crecimiento o supervivencia aplicables a los microorganismos en cuestión presentes en el producto,
- pruebas para investigar la capacidad que tiene el microorganismo en cuestión, adecuadamente inoculado, para crecer o sobrevivir en el producto en diferentes condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles,
- estudios para evaluar el crecimiento o supervivencia de los microorganismos en cuestión que puedan estar presentes en el producto durante su vida útil en condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y utilización.

Los estudios anteriormente citados tendrán en cuenta la variabilidad inherente al producto, los microorganismos en cuestión y las condiciones de transformación y almacenamiento.

Propósito y alcance del documento

El propósito de este documento es dar pautas para la aplicación de lo dispuesto en el anexo II del Reglamento (CE) Nº 2073/2005 sobre criterios microbiológicos en alimentos.

Puesto que el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para *Listeria monocytogenes* ha publicado una guía muy completa sobre metodología para llevar a cabo los ensayos de desafío y los estudios de durabilidad, el alcance de este documento se limita a establecer unos criterios que permitan al fabricante de alimentos elegir la metodología más adecuada en cada caso particular (alimento o formulación) de forma que los resultados obtenidos permitan su evaluación por parte de las autoridades competentes para comprobar si se garantiza convenientemente la inocuidad de los productos de acuerdo con la reglamentación sobre criterios microbiológicos aplicable en este caso.

Herramientas para establecer la vida útil

1. Introducción

El Reglamento (CE) Nº 2073/2005 establece tres tipos de alimentos listos para su consumo (LPC) en lo que se refiere al control de *Listeria monocytogenes*.

En un primer grupo aparecen los alimentos LPC para lactantes y alimentos para el consumo destinados a usos médicos especiales en los que *L. monocytogenes* debe estar ausente en los productos comercializados (ausencia en 25 gramos de producto tras el análisis de diez muestras).

En un segundo grupo se incluyen los alimentos LPC que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes* y en los que se debe garantizar que a lo largo de la vida útil la concentración de *L. monocytogenes* no supere 100 ufc/g (análisis de cinco muestras, $c=0$) o que antes de dejar el control de la fabricación la concentración de *Listeria* sea de ausencia en 25 gramos (análisis de cinco muestras, $c=0$) cuando el explotador no pueda demostrar que el producto no superará los 100 ufc/g.

El tercer grupo se corresponde con aquellos alimentos que no favorecen el desarrollo de *L. monocytogenes* o que tienen un vida útil inferior a los cinco días, en los que el límite se establece en las 100 ufc/g tras el análisis de cinco muestras.

Las evidencias relacionadas con estas exigencias se deben basar en estudios de vida útil, que

consistirán inicialmente en conseguir la información necesaria sobre la composición del alimento en cuestión (características químicas y físicas, por ejemplo) y examen de la literatura científica relevante en relación a dicha composición. Si el resultado de estos estudios dan la seguridad necesaria para decir que la *Listeria monocytogenes* no puede crecer en el alimento, no es necesario seguir con estudios posteriores. Sin embargo, si los resultados arrojan dudas respecto a la posibilidad de crecimiento del microorganismo, entonces es necesario llevar a cabo una serie de estudios adicionales que pueden incluir uno o más de los siguientes (CFA, 2010):

- Histórico de datos de productos fabricados.
- Microbiología predictiva.
- Estudios de vida útil específicos en laboratorio (estudios de durabilidad, ensayos de desafío).

La vida útil se define como un periodo de tiempo durante el cual el alimento permanece inocuo y cumple con sus especificaciones de calidad durante su almacenamiento y uso esperado. La vida útil indica la fecha de duración y se expresa en el producto como “usar hasta” una determinada fecha o “consumir preferentemente antes” de una determinada fecha, tal como describe el artículo 11 del Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios.

Los estudios de vida útil se deben llevar a cabo en las siguientes circunstancias (UE, 2008):

- Desarrollo de nuevos productos o modificación de los existentes llevados a cabo por las industrias.
- Desarrollo de nuevos procesos o modificaciones llevados a cabo por las industrias.
- Desarrollo de nuevos envases y procedimientos de envasado llevado a cabo por las industrias.
- Cualquier cambio significativo en los ingredientes y en el envasado de un producto existente.
- Cambios de lugar de producción o equipo de producción.
- Cuando no hay estudios previos de vida útil.

2. Información proporcionada por las características del producto y literatura científica

Características del producto

Los estudios de vida útil deberán incluir siempre información sobre la composición específica del alimento objeto del estudio y comparación con la literatura científica relevante relativa a las características de crecimiento y supervivencia del microorganismo patógeno en cuestión (FSAI, 2005a).

Las características intrínsecas del producto tales como pH, a_w (actividad de agua) concentración de sal así como la concentración de conservantes y las extrínsecas, afectan a la supervivencia y crecimiento de la *Listeria monocytogenes* en el alimento y marcan la forma en que el alimento debe ser envasado y el tiempo y temperatura de almacenamiento. Por consiguiente, se deben determinar con claridad estas características fisicoquímicas. Esta determinación se debe hacer en las condiciones normales de elaboración, envasado y almacenamiento del producto, teniendo en cuenta la posibilidad de recontaminación y la vida útil prevista para el mismo. La Tabla 1 muestra algunas características intrínsecas y extrínsecas que se deben tener en cuenta en estudios de vida útil.

Tabla 1. Factores intrínsecos y extrínsecos de los alimentos	
Características intrínsecas	Características extrínsecas
Calidad microbiológica de materias primas	Buenas prácticas higiénicas y de fabricación
Histórico de las materias primas	APPCC ¹
Composición y formulación del alimento	Procesado de alimentos
Estructura y ensamblado del alimento	Temperatura de almacenamiento
pH	Composición de gases
Tipo de ácido presente	Humedad relativa
Actividad de agua (a_w)	Envasado
Potencial Redox (Eh)	Prácticas en venta al por menor
Estructuras biológicas	Prácticas del consumidor
Disponibilidad de oxígeno	–
Contenido nutricional y disponibilidad	–
Constituyentes antimicrobianos	–
Microbiota natural o artificial presente en el alimento	–

¹APPCC: Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos. **Adaptada de** (Jay, 1992) (Mc Donald, 1999).

Si no hay experiencia en la empresa para llevar a cabo estas determinaciones, se recomienda acudir a un centro de investigación o laboratorio especializado que ayude al procesador de alimentos a entender y conseguir la información necesaria (CFA, 2010).

Determinar las características del alimento permitirá averiguar si *Listeria monocytogenes* puede o no crecer en dicho alimento. De acuerdo a la información publicada en el Reglamento sobre criterios microbiológicos (UE, 2005), se puede considerar que un alimento no permite el crecimiento de *Listeria monocytogenes* si tiene las siguientes características intrínsecas:

- pH es igual o menor a 4,4.
- a_w es menor o igual a 0,92.
- pH es menor o igual a 5,0 con una a_w menor o igual a 0,94.

No obstante en otros documentos y guías, se consideran valores de pH menores o iguales a 4,2 o 4,3 y actividades de agua menores o iguales a 0,90 como las condiciones bajo las cuales, *Listeria monocytogenes* no puede crecer en el alimento (FSAI, 2003) (UE, 2004) (UE, 2008) (CFA, 2010). Estas condiciones intrínsecas son algo más restrictivas que las publicadas en el Reglamento sobre criterios microbiológicos (UE, 2005).

Si estos parámetros se utilizan para demostrar que *Listeria monocytogenes* no puede crecer en ese alimento, entonces se deberían considerar como límites críticos a controlar como parte del sistema APPCC y no se necesitarán estudios posteriores de vida útil en relación a *Listeria monocytogenes*. Si hay una evidencia científica de que *Listeria monocytogenes* no puede crecer en el alimento debido a sus características fisicoquímicas (intrínsecas) se debe aplicar el límite de 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes* a lo largo de la vida útil del alimento tal como indica la legislación.

Bibliografía científica

Actualmente existe una amplia cantidad de datos sobre *Listeria monocytogenes* en libros, publicaciones científicas, universidades y centros de investigación públicos y privados. También hay datos disponibles

en las distintas agencias nacionales, europeas o internacionales (por ejemplo, *European Food Safety Authority*).

Cuando el operador de alimentos ha establecido las características de su producto y las condiciones bajo las cuales el producto será envasado y almacenado, debe compararlas con las que existen en la literatura científica respecto a la capacidad de supervivencia o crecimiento de *Listeria monocytogenes* o cualquier otro microorganismo patógeno. La Tabla 2 muestra algunos factores que limitan la supervivencia y crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Tabla 2. Factores que impactan en el crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytogenes*

Factor	Puede crecer			Puede sobrevivir, pero no crecer
	Límite inferior	Óptimo	Límite superior	
Temperatura (°C)	-1,5 a +3,0	30,0 a 37,0	45,0	-18,0
pH	4,2 a 4,3	7,0	9,4 a 9,5	3,3 a 4,2
Actividad de agua (a _w)	0,90 a 0,93	0,99	>0,99	<0,90
Concentración de sal (%)	<0,5	0,7	12 a 16	≥20
Atmósfera	Es un anaerobio facultativo que puede crecer en ausencia de oxígeno, por ejemplo, envasado a vacío o atmósfera modificada			

Adaptada de (FSAI, 2003) (UE, 2004, 2008).

3. Estudios complementarios

Si la comparación de las características del producto con la literatura científica relevante u otros datos, no permite tener garantías de que *Listeria monocytogenes* no puede crecer en el alimento, entonces es necesario llevar a cabo estudios adicionales que pueden incluir análisis y uso del histórico de datos, uso de microbiología predictiva o estudios de durabilidad o ensayos de desafío. Todos estos estudios deben tener en cuenta la variabilidad inherente unida a los alimentos, al microorganismo en cuestión y a las condiciones de almacenamiento y procesado.

Histórico de datos

Todas las empresas deben mantener registros incluyendo aquellos sobre la inocuidad de alimentos que se encuentran ya en el mercado. Esta información se denomina histórico de datos y corresponde a los registros específicos de los lugares de producción y alimentos, que se van acumulando a lo largo del tiempo.

Estos datos (incluyendo las comprobaciones en el producto final en el mismo día de la producción y final de la vida útil) se pueden usar como evidencia de que la concentración de *Listeria monocytogenes* en el alimento no excede el límite de 100 ufc/g. Los datos sobre los niveles de *Listeria monocytogenes* en alimentos LPC ya existentes se pueden usar para evaluar la posibilidad de crecimiento potencial y confirmar que la vida útil asignada al alimento es apropiada. También se pueden aplicar a alimentos LPC similares con características intrínsecas comparables, elaborados bajo prácticamente las mismas condiciones de proceso.

Los datos a utilizar deben ser (CFA, 2010):

- Aquellos provenientes del APPCC y controles de seguimiento y deben incluir lo siguiente:
 - Validación de procesos, verificación y seguimiento (temperatura, pH, a_w).
 - Trazabilidad de ingredientes y comprobación de la calidad microbiológica.
 - Muestreo de especies de *Listeria* (incluidas las no patógenas) y de organismos indicadores de higiene apropiados en las distintas áreas de la industria procesadora y del equipo.
 - Comprobación de presencia y concentración de *Listeria monocytogenes* en el producto acabado, por ejemplo en el mismo día de producción y al final de la vida útil, con ello se verifica el funcionamiento efectivo del APPCC y se verifica la durabilidad.
- Aquellos provenientes de la evaluación de la vida útil.

El nivel de confianza incrementa con la cantidad de datos disponibles en la empresa, por tanto cuantas mas unidades de producto se comprueben mayor será la fiabilidad del histórico de datos (UE, 2008). No obstante, no es posible recomendar una cantidad específica de datos ya que esta es una aproximación basada en el riesgo y depende de variaciones en el proceso de elaboración y naturaleza del alimento (CFA, 2010).

Microbiología predictiva

La microbiología predictiva puede ser una herramienta a tener en cuenta cuando es necesario llevar a cabo estudios adicionales para confirmar la vida útil que se ha establecido para un alimento.

La microbiología predictiva tiene como objeto predecir el comportamiento de los microorganismos en los alimentos durante su producción o almacenamiento. En los últimos años se han producido avances significativos en este campo especialmente para estimar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en alimentos. De hecho, el programa de predicción de crecimiento microbiano *Combase* (2010) es una fuente disponible para todas las empresas y puede ayudar en la determinación del crecimiento. También hay varias herramientas que se pueden combinar con el *Combase* para ayudar a las pequeñas empresas en la determinación de los controles de su proceso (Dalgaard, 2009). Otros programas de interés son el *Growth Predictor* que se puede obtener de forma gratuita en la siguiente dirección: www.lfr.ac.uk/safety/growthpredictor y *Pathogen Modelling Programme* que igualmente se puede obtener de forma gratuita en la siguiente dirección: <http://ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6786>.

En general, introduciendo factores intrínsecos clave del alimento (pH, a_w o concentración de sal), y datos del proceso a un modelo microbiológico predictivo (programa de ordenador) es posible obtener una indicación del crecimiento potencial de un determinado microorganismo para el cual se desarrolló el modelo. No obstante, conviene señalar que los datos para construir modelos matemáticos se suelen obtener en experimentos llevados a cabo en el laboratorio, por consiguiente los modelos se deben validar frente a datos de supervivencia y crecimiento obtenidos en el propio alimento antes de su utilización.

Los modelos matemáticos predictivos pueden ser útiles en las siguientes aplicaciones (UE, 2008):

- Para predecir el crecimiento bacteriano en varias condiciones.
- Para predecir la probabilidad de crecimiento de los microorganismos en los alimentos.

- Para estimar el nivel de contaminación en un momento dado de la vida útil.
- Para estimar la variabilidad entre dos lotes.
- Para optimizar la formulación del alimento asegurando la mayor estabilidad.
- Para evaluar el impacto de la rotura de la cadena de frío y ensayar diferentes condiciones de almacenamiento.
- Para ayudar en la identificación de Puntos Críticos de Control en un proceso.

En relación al uso de los modelos matemáticos hay que tener en cuenta que muchos de ellos se han obtenido en medios líquidos, la mayoría de ellos homogéneos, con el fin de determinar el impacto de determinados factores medioambientales sobre los microorganismos. En estos casos puede que el modelo no haga buenas predicciones describiendo el comportamiento de los microorganismos en los alimentos, aunque el modelo haya sido validado en el alimento. Otros modelos se han obtenido en los propios alimentos y pueden describir con bastante exactitud el comportamiento del microorganismo en un alimento específico durante el almacenamiento, sin embargo puede ser cuestionable la descripción del impacto de la variabilidad de las características fisicoquímicas del alimento o hacer predicciones para otros alimentos distintos al original.

Hay ocasiones en que las predicciones no son exactas debido a respuestas inconsistentes de los microorganismos o ligeras variaciones en el medio de cultivo. Algunas investigaciones han demostrado que estas son las razones que hay detrás de la falta de exactitud de algunos modelos predictivos en la predicción de la supervivencia y crecimiento de los microorganismos (FDA, 2001).

En conclusión, aunque los modelos matemáticos predictivos proporcionan un medio poco costoso para minimizar el muestreo microbiológico en estudios de vida útil, se deben usar con precaución y solo por personal entrenado, con experiencia y conociendo las limitaciones y las condiciones de uso.

Estudios de laboratorio específicos para vida útil

Adicionalmente se pueden llevar a cabo estudios específicos en el laboratorio para determinar el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Estos estudios se conocen como ensayos de desafío (inoculación experimental del alimento) y estudios de durabilidad.

Ensayos de desafío

En general, estos ensayos solo se usan cuando otros métodos de evaluación de la inocuidad o estabilidad del alimento no se pueden llevar a cabo o no dejan suficientemente claro que *Listeria monocytogenes* no puede crecer en el alimento o existen dudas sobre la idoneidad de la vida útil establecida para dicho alimento. Los ensayos de desafío proporcionan información sobre el comportamiento de los microorganismos (*Listeria monocytogenes*) inoculados en el alimento, antes de su almacenamiento, bajo unas condiciones medioambientales determinadas en un ambiente de laboratorio (Betts, 2010). La Unión Europea estableció protocolos para llevar a cabo los ensayos de desafío (UE, 2008). En esencia consisten en inocular el alimento con una concentración definida de una mezcla de cepas de *Listeria monocytogenes* y medir los cambios en las tasas poblacionales del microorganismo durante el almacenamiento considerando el caso más desfavorable. Este tipo de ensayo debe tener en cuenta

la variabilidad en los alimentos (uso de diferentes lotes) y la contaminación específica del alimento (inoculación de cepas aisladas del alimento). No obstante, es difícil mimetizar el nivel de contaminación, la heterogeneidad de la contaminación y el estado fisiológico de las bacterias (AFSSA, 2008).

Los ensayos de desafío o inoculación experimental, sirven para evaluar el potencial de crecimiento de un microorganismo, es decir si puede o no crecer en un alimento específico (δ) o estimar parámetros de crecimiento como la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}).

Los estudios deben simular un abuso razonable de temperatura durante la venta al por menor y durante el almacenamiento del alimento listo para su consumo (LPC) por el consumidor (Scott et al., 2005).

Es aconsejable utilizar inóculos con baja concentración de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* con objeto de introducir la variabilidad en los resultados (Metris et al., 2008). Las cepas usadas deben ser las típicas encontradas en el producto a evaluar pero también debe incluirse cepas clínicas y aquellas que son resistentes al estrés medioambiental durante la vida útil del producto (Luber et al., 2011).

Estudios para establecer el potencial de crecimiento

Un ensayo de desafío (inoculación experimental) para evaluar el potencial de crecimiento, consiste en un estudio de laboratorio en el que se inocula artificialmente *Listeria monocytogenes* en el alimento y se mide su crecimiento durante el almacenamiento en las condiciones de transporte distribución y almacenamiento previsibles. Las condiciones deben ser realistas, es decir que pueden tener lugar a lo largo de la cadena de frío, incluyendo las condiciones de almacenamiento después de la producción y hasta el consumo (AFSSA, 2008).

El potencial de crecimiento de un microorganismo (δ) es la diferencia entre el \log_{10} ufc/g al final del ensayo y el \log_{10} ufc/g al comienzo del ensayo. Este parámetro depende de varios factores entre los que se pueden destacar los siguientes (UE, 2008):

- Cepa o cepas inoculadas.
- Daño o estrés (estado fisiológico) de las cepas inoculadas.
- Propiedades intrínsecas del alimento (pH, a_w , concentración de sal, microflora asociada, componentes antimicrobianos).
- Propiedades extrínsecas (perfil de temperatura, composición de gases).

De todos estos factores, es la temperatura la que mayor influencia puede tener en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en un alimento dado (EFSA, 2007).

La evaluación del potencial de crecimiento permite (AFSSA, 2008):

- Clasificar a los alimentos como LPC.
 - Cuando $\delta > 0,5 \log_{10}$ ufc/g, el alimento se clasifica como LPC capaz de permitir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, no destinado a lactantes o a usos médicos especiales.
 - Cuando $\delta \leq 0,5 \log_{10}$ ufc/g el alimento se clasifica como LPC que no permite el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, no destinado a lactantes o a usos médicos especiales.
- Cuantificar el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en un alimento de acuerdo con las condiciones previsibles entre la producción y el consumo, razonablemente definidas (por ejemplo, calcular la concentración al final de la vida útil partiendo de una concentración inicial).

- Determinar la concentración de *Listeria monocytogenes* en el momento de la producción que permitirá que se cumpla con el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

La principal ventaja de este método es que es relativamente simple de llevar a cabo y que los resultados se pueden usar directamente de acuerdo a lo anteriormente dicho. La desventaja es que es poco flexible en su interpretación: los resultados solo sirven para el alimento estudiado en las condiciones determinadas, de tal forma que cada vez que hay un cambio en el producto o proceso, se deben llevar a cabo nuevos estudios, con los niveles de réplicas y repeticiones adecuados para que el resultado sea estadísticamente significativo.

Estudios para establecer la velocidad máxima de crecimiento

Las desventajas del estudio para determinar el potencial de crecimiento se pueden resolver combinando modelos de microbiología predictiva y ensayos para evaluar la velocidad de crecimiento (por ejemplo, μ_{max}) (AFSSA, 2008). Estos experimentos son más caros y consumen más tiempo que los ensayos de desafío para evaluar el potencial de crecimiento. Estos estudios están restringidos a aquellos casos en los que se puede aplicar la microbiología predictiva y se deben llevar a cabo en laboratorios con experiencia en desarrollo y aplicación de modelos matemáticos predictivos.

Un ensayo de desafío para evaluar la velocidad de crecimiento consiste esencialmente en un estudio llevado a cabo en el laboratorio en el que se mide la velocidad de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en un alimento contaminado de forma artificial y almacenado a una temperatura apropiada. La temperatura usada para la experimentación no necesita ser la misma que la utilizada para llevar a cabo las predicciones, ya que es posible predecir lo que ocurre a temperaturas distintas a la del estudio si se dispone de un modelo predictivo secundario (por ejemplo, un modelo polinómico) o a lo largo de un perfil tiempo temperatura que se escoge como representación de las condiciones de transporte, distribución y almacenamiento previsibles.

Técnicamente, una vez que se ha concluido el ensayo a la temperatura del estudio, la velocidad máxima de crecimiento de la *Listeria monocytogenes* se puede deducir de la curva de crecimiento obtenida. Para ello se representa el logaritmo natural del número de células en la fase exponencial frente al tiempo de almacenamiento, se realiza una regresión lineal y la pendiente de la curva de regresión representa la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}), el resultado se puede expresar en $horas^{-1}$ o $días^{-1}$.

La velocidad máxima de crecimiento depende de los siguientes factores:

- La cepa o cepas inoculadas.
- Propiedades intrínsecas del alimento (pH, a_w , concentración de sal, microflora asociada, componentes antimicrobianos).
- Propiedades extrínsecas (perfil de temperatura, composición de gases).

Si tenemos estudios a diferentes temperaturas se puede construir un modelo matemático secundario que nos permita deducir la velocidad máxima de crecimiento a temperaturas distintas, siempre en el mismo alimento.

Este tipo de ensayo de desafío permite obtener la siguiente información (AFSSA, 2008):

- Una estimación de la concentración de *Listeria monocytogenes* en un momento dado de la vida útil del alimento si se conoce la concentración inicial en el alimento inmediatamente después de su elaboración.
- Una estimación de la concentración máxima de *Listeria monocytogenes* permitida en un alimento que puede estar presente el día en que se elaboró con objeto de cumplir con el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

Estudios de durabilidad

Los estudios de durabilidad permiten evaluar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en un alimento durante el almacenamiento bajo unas condiciones razonablemente previsibles sin que se produzca una inoculación artificial, solamente considerando la contaminación natural del mismo. Estos estudios son más realistas que los ensayos de desafío, ya que se estudia la evolución de la contaminación natural del producto. No obstante, la interpretación de los estudios de durabilidad puede resultar difícil debido a que la prevalencia de unidades contaminadas con *Listeria monocytogenes* puede ser muy baja, la baja concentración de *Listeria monocytogenes* presente en el producto objeto de estudio y la heterogeneidad de la distribución de *Listeria monocytogenes* en el alimento. Esto implicaría la necesidad de llevar a cabo otros ensayos complementarios como los ensayos de desafío.

El registro de los estudios de durabilidad llevados a cabo en el mismo producto bajo las mismas condiciones de procesado, como representación de la variabilidad en las condiciones de fabricación, permiten evaluar los niveles de *Listeria monocytogenes* en el alimento objeto del estudio, al final del ensayo. Se puede usar para evaluar la proporción (con su intervalo de confianza asociado) de unidades (unidades comerciales) que excederían el valor límite de 100 ufc/g al final de la vida útil después del periodo de almacenamiento, reflejando las condiciones de almacenamiento y distribución previsibles. En este tipo de estudios el nivel de confianza aumenta con la cantidad de datos disponibles. Cuantas más unidades de producto sean evaluadas, más fiable será el estudio de vida útil (AFSSA, 2008) (UE, 2008).

Conclusiones del Comité Científico

1. La evidencia de que los alimentos listos para su consumo (LPC) no superarán el límite de 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes* para cada producto a lo largo de su vida útil (Reglamento (CE) Nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005), se debe basar en estudios de vida útil, que consistirán inicialmente en el conocimiento de si el alimento permite o no el desarrollo de *L. monocytogenes* a partir de la información sobre la composición específica del alimento en cuestión (características intrínsecas y extrínsecas) y comparación con datos procedentes de la literatura científica relevante relativa a las características de crecimiento y supervivencia del microorganismo patógeno en cuestión.
2. Los estudios de vida útil se deben llevar a cabo en las industrias cuando concurren las siguientes circunstancias:
 - Desarrollo de nuevos productos o modificación de los existentes.

- Desarrollo de nuevos procesos o modificaciones sustanciales de procesos previos.
 - Desarrollo de nuevos envases y procedimientos de envasado.
 - Cualquier cambio significativo en los ingredientes y en el envasado de un producto existente.
 - Cambios de lugar de producción o equipo de producción.
 - Cuando no hay estudios previos de vida útil.
3. El histórico de datos de productos fabricados, la microbiología predictiva y los estudios de vida útil específicos en laboratorio (estudios de durabilidad y ensayos de desafío) son herramientas adicionales que se utilizarán en caso de que los estudios de composición del alimento y condiciones de proceso y comparación con datos publicados en revistas científicas proporcionen dudas respecto a la posibilidad de crecimiento de *Listeria monocytogenes*.
 4. Los modelos matemáticos predictivos proporcionan un medio poco costoso para minimizar el muestreo microbiológico en estudios de vida útil cuando el producto está sujeto a un ligero proceso de formulación o cambio y en las fases tempranas de desarrollo. Sin embargo, se deben utilizar con precaución y solo por personal entrenado, con experiencia y conociendo las limitaciones y las condiciones de uso. Se recomienda que se consulte con una entidad competente antes de su uso.
 5. En general, los ensayos de desafío solo se usarán cuando otros métodos de evaluación de la inocuidad o estabilidad del alimento no se pueden llevar a cabo o no dejan suficientemente claro que *Listeria monocytogenes* no puede crecer en el alimento o existen dudas sobre la idoneidad de la vida útil establecida para dicho alimento. Deben usarse con gran cautela y se recomienda la consulta con una entidad competente y con experiencia en este tipo de estudios antes de su uso.
 6. La principal ventaja del ensayo de desafío para obtener el potencial de crecimiento es su relativa simplicidad para llevarse a cabo y que los resultados se pueden usar directamente. La principal desventaja es que es poco flexible en su interpretación y los resultados solo sirven para el alimento estudiado en las condiciones determinadas, de tal forma que cada vez que hay un cambio en el producto o proceso, se deben llevar a cabo nuevos estudios.
 7. Los estudios para obtener la velocidad máxima de crecimiento permiten disponer de una estimación de la concentración de *Listeria monocytogenes* en un momento dado de la vida útil del alimento si se conoce la concentración inicial del alimento inmediatamente después de su elaboración y una estimación de la concentración máxima de *Listeria monocytogenes* permitida en un alimento, que puede estar presente el día en que se elaboró, con objeto de cumplir con el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.
 8. Los estudios de durabilidad en alimentos son más realistas que los estudios de desafío ya que se estudia la evolución de la contaminación natural de los mismos. Sin embargo, la interpretación de los estudios de durabilidad puede resultar difícil debido a que la prevalencia de unidades contaminadas con *Listeria monocytogenes* sea muy baja, la baja concentración de *Listeria monocytogenes* presente en el producto objeto de estudio y la heterogeneidad de la distribución de *Listeria monocytogenes* en el alimento.
 9. Las industrias deben establecer sus propios protocolos y procedimientos de operación o de obtención de información para permitir una determinación de la vida útil del producto consistente y exacta. Si la industria no tiene los recursos suficientes para determinar la vida útil, se recomienda

que se busque el consejo de un centro o laboratorio competente, con la experiencia suficiente y acreditación reconocida para llevar a cabo pruebas microbiológicas y evaluación de vida útil de alimentos.

10. Es recomendable que la industria aplique un margen de seguridad en los estudios de vida útil, lo que permite tener en cuenta las condiciones previsibles de uso que pueden afectar a la inocuidad y a la vida útil del producto. En la aplicación del margen de seguridad la industria debe tener en cuenta cualquier variación esperada durante la producción, transporte, almacenamiento y uso del alimento.
11. Tanto si los estudios de vida útil se realizan en la industria como si se realizan por un laboratorio reconocido, se deben utilizar métodos microbiológicos de referencia o reconocidos internacionalmente (por ejemplo, ISO). Si se utilizan métodos propios se deben validar y documentar convenientemente para demostrar su equivalencia con los métodos de referencia.

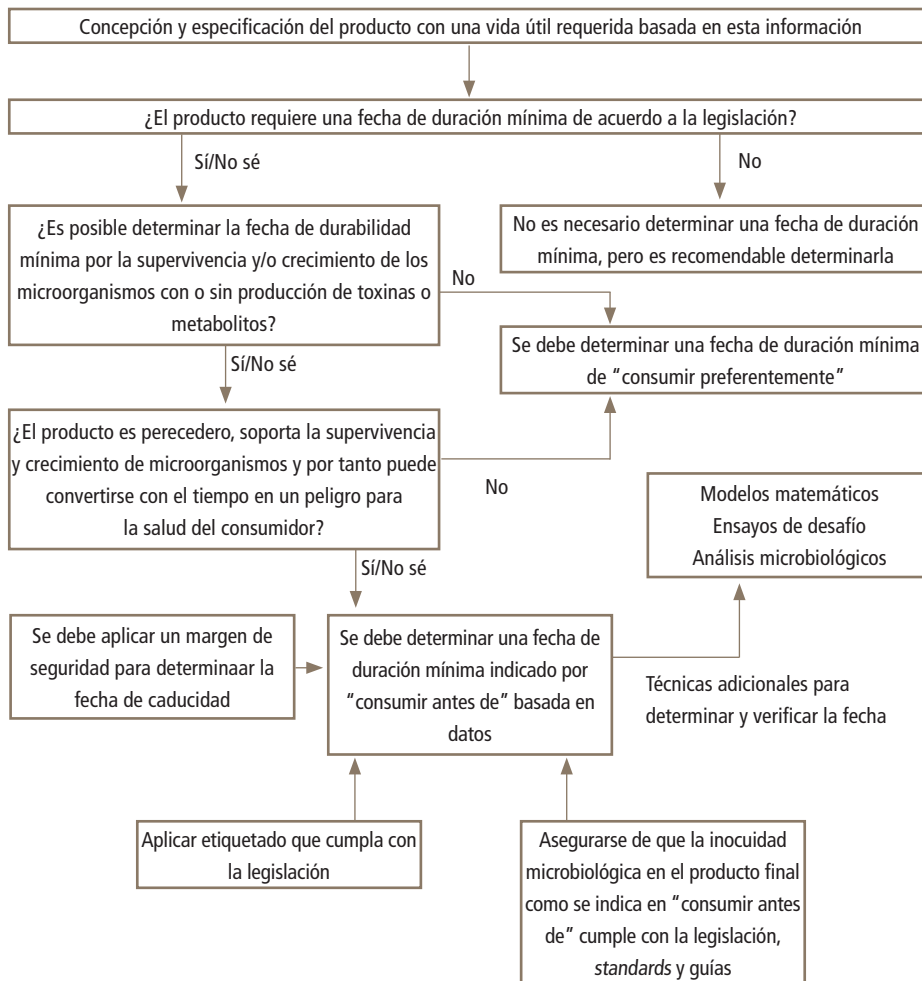
Referencias

- AFSSA (2008). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Technical Guidance Document on shelf life studies for *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. EU Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*.
- Betts, G. (2010). Challenge testing protocols for assessing the safety and quality of food and drink. *Campden BRI Guideline*, 63.
- CFA (2010). Chilled Food Association. Shelf life of ready to eat foods in relation to *L. Monocytogenes*. Guidance for food business operators. Disponible en: <http://www.chilledfood.org/Resources/Chilled%20Food%20Association/Public%20Resources/Shelf%20life%20of%20RTE%20foods%20in%20relation%20to%20Lm%20FINAL%20v1.1.1%2023%203%2010.pdf> [acceso: 21-6-11].
- Combase (2010). Combined database por predictive microbiology. Disponible en: <http://www.combase.cc> [acceso: 21-6-11].
- Dalgaard, P. (2009). Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) software v. 3.1. National Food Institute (DTU Food), Technical University of Denmark. Disponible en: <http://sssp.dtuqua.dk/Download.aspx> [acceso: 21-6-11].
- EFSA (2007). European Food Safety Authority. Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. *The EFSA Journal*, 599, pp: 1-42.
- FDA (2001). United States Food and Drug Administration. Factors that influence microbial growth. Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094141> [acceso: 21-6-11].
- FSAI (2003). Food Safety Authority of Ireland. HACCP a food safety management system: Terminology explained. Disponible en: http://www.fsai.ie/resources_and_publications/haccp_publications.html [acceso: 21-6-11].
- FSAI (2005a). Food Safety Authority of Ireland. Guidance Note No. 18. Determination of Product Shelf-Life. Disponible en http://www.fsai.ie/resources_and_publications.html [acceso: 21-6-11].
- FSAI (2005b). Food Safety Authority of Ireland. The control and management of *Listeria monocytogenes* contamination of food. Disponible en: http://www.fsai.ie/resources_and_publications.html [acceso: 21-6-11].
- Jay, J.M. (1992). Intrinsic and extrinsic parameters of foods that affect microbial growth. En libro: *Modern Food Microbiology*, 4ª edición. New York. Jay, J.M. Chapman & Hall, pp: 38-62.
- Luber, P., Scott, C., Christophe, D., Jeff, F., Atin, D. y Ewen, C.D.T. (2011). Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization. Recommendations for improved prevention and control. *Food Control*, 22, pp: 1535-1549.
- Mc Donald, K. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 52, pp: 1-27.

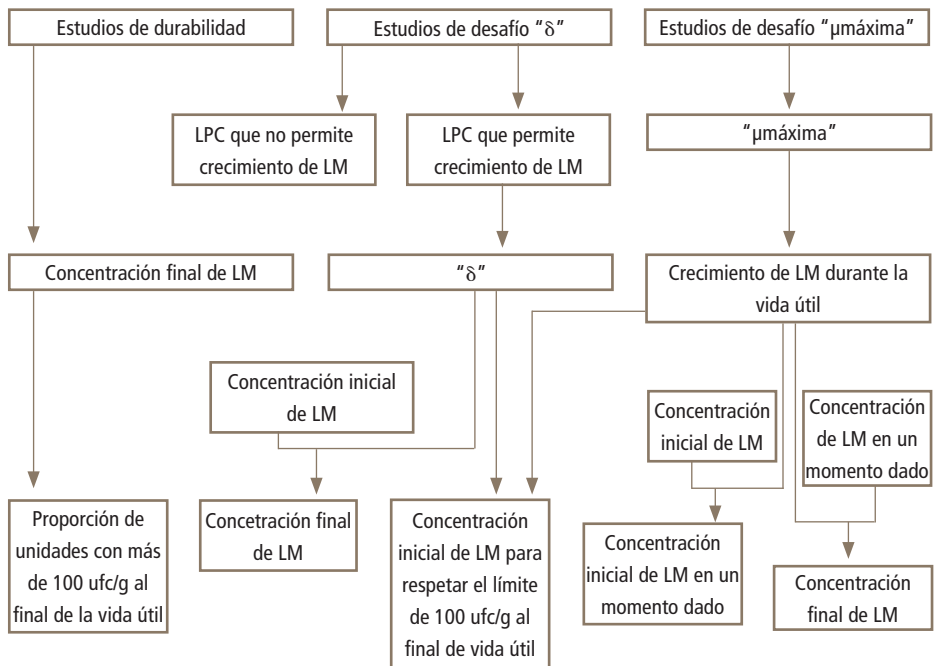
- Metris, A., George, S.M., Mackey, B.M. y Baranyi, J. (2008) Modelling the variability of single cell lag times for *Listeria* innocua populations after sublethal and lethal heat treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (22), pp: 6949-6955.
- Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. BOE 202 de 24 de agosto de 1999, pp: 437-441.
- Scott, V.N., Swanson, K.M., Freier, T.A., Pruet W.P., Sveum, W.H. y Hall, P.A. (2005). Guidelines for conducting *Listeria monocytogenes* challenge testing of foods. *Food Protection Trends*, 25 (11), pp: 818-825.
- UE (2004). Corrigendum to Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. DO L 226 de 25 de junio de 2004, pp: 3.
- UE (2005) Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO L 338 de 22 de diciembre de 2005, pp: 12-45.
- UE (2008). Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc_Listeria_monocytogenes_en.pdf [acceso: 21-6-11].

Fuentes internacionales de datos	
<i>Athlone Institute of Technology</i>	www.ait.ie/
<i>An Bord Bia</i>	www.bordbia.ie/
<i>Carlow Institute of Technology</i>	www.itcarlow.ie/news_events/index.php
<i>Codex Alimentarius</i>	www.codexalimentarius.net
<i>Consumers Association of Ireland</i>	www.consumerassociation.ie/
<i>Cork Institute of Technology</i>	www.cit.ie/
<i>Dept. of Agriculture and Food</i>	www.irlgov.ie/daff/
<i>Dublin Institute of Technology</i>	www.dit.ie/DIT/Homepage/index.html
<i>Dundalk Institute of Technology</i>	www.dkit.ie/
<i>European Committee for Standardisation</i>	www.cenorm.be/cenorm/index.htm
<i>European Food Safety Authority</i>	www.efsa.eu.int
<i>European Legislation</i>	http://europa.eu.int/eur-lex/en/index.html
<i>European Union Risk Analysis Information Network</i>	www.eu-rain.com/
<i>Excellence Ireland Hygiene</i>	www.hygienemark.com/
<i>Food and Agriculture Organisation</i>	www.fao.org/
<i>Food and Drug Administration</i>	www.fda.gov/default.htm
<i>Food Safety Authority of Ireland</i>	www.ifrn.bbsrc.ac.uk/
<i>Galway-Mayo Institute of Technology</i>	www.gmit.ie/
<i>International Journal of Food Microbiology</i>	www.elsevier.com/
<i>International Life Sciences Institute</i>	www.ilsa.org/
<i>Institute of Food Research</i>	www.fsai.ie
<i>Institute of Food Science and Technology</i>	www.ifst.org/
<i>Institute of Food Technologists</i>	www.ift.org/
<i>International Standards Organisation</i>	www.iso.org/iso/
<i>Irish Legislation</i>	www.irishstatutebook.ie/front.html
<i>Irish National Accreditation Board</i>	www.inab.ie/
<i>Journal of Food Protection</i>	www.foodprotection.org/
<i>Journal of Food Safety</i>	www.foodscipress.com/
<i>Limerick Institute of Technology</i>	www.lit.ie/
<i>Microbial Risk Assessment of Meat Products</i>	http://smas.chemeng.ntua.gr/miram/
<i>National University of Ireland</i>	www.nui.ie/
<i>Physical Properties of Food Database</i>	www.nelfood.com
<i>Relay (Research for the Food Industry)</i>	www.relayresearch.ie/
<i>Teagasc</i>	www.teagasc.ie/
<i>University of Limerick</i>	www.ul.ie/
<i>Waterford Institute of Technology</i>	www.wit.ie/

1. Determinación de la vida útil de un alimento (FSAI, 2010)



2. Datos obtenidos de un ensayo de desafío y estudios de durabilidad (AFSSA, 2008)



Definiciones

Unidades Formadoras de Colonias (ufc). Células microbianas que forman una única colonia en una placa con medio de cultivo apropiado.

pH. Medida de la acidez o alcalinidad de un alimento.

Vida útil. La vida útil se define como el periodo de tiempo durante el cual un producto permanece seguro y cumple con sus especificaciones de calidad bajo las condiciones de almacenamiento esperadas. La vida útil determina la fecha de duración expresada en la etiqueta tal como indica la legislación vigente.

Estudios de vida útil. Los estudios de vida útil deben demostrar que el alimento cumple con el límite del criterio de seguridad (máximo de 100 ufc/g) establecido para *Listeria monocytogenes* a lo largo de su vida útil.

Actividad de agua (a_w). Medida del agua disponible para la actividad metabólica y crecimiento de un microorganismo.

Potencial de crecimiento (δ). Diferencia entre el \log_{10} ufc/g al final del ensayo de desafío y el \log_{10} ufc/g al comienzo del ensayo.

Velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}). Es la pendiente de la línea de regresión del crecimiento exponencial durante un ensayo de desafío.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a la evaluación del riesgo de la exposición de lactantes y niños de corta edad a nitratos por consumo de acelgas en España

Miembros del Comité Científico

Rosaura Farré Rovira, Francisco Martín Bermudo, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Mariano Domingo Álvarez, Antonio Herrera Marteache, Félix Lorente Toledano, M^o Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, M^o Rosa Martínez Larrañaga, Antonio Martínez López, Cristina Nerín de la Puerta, Teresa Ortega Hernández-Agero, Perfecto Paseiro Losada, Catalina Picó Segura, Rosa María Pintó Solé, Antonio Pla Martínez, Daniel Ramón Vidal, Jordi Salas-Salvadó, M^o Carmen Vidal Carou.

Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2011-004

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de mayo de 2011

Grupo de Trabajo

Ana M^o Cameán Fernández (Coordinadora)
M^o Rosa Martínez Larrañaga
Cristina Nerín de la Puerta
Antonio Pla Martínez
Ricardo López Rodríguez (AESAN)

Resumen

La principal vía de exposición en humanos a los nitratos es a través de la dieta, siendo las hortalizas la principal fuente dietética pues proporcionan entre el 80 y 85% de la ingesta diaria. Destacan las concentraciones relativamente elevadas encontradas en hortalizas, como rúcula, lechuga y espinacas.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha evaluado recientemente los posibles efectos en niños de los nitratos contenidos en algunas verduras de hoja, concluyendo que los contenidos de nitratos en lechuga no representan un riesgo, aunque en el caso de las espinacas, se indica la posible existencia de riesgo de metahemoglobinemia en niños de 1-3 años si el consumo de éstas excede de una ración diaria (EFSA, 2010).

El presente informe presenta una evaluación del riesgo de la exposición de lactantes y niños de corta edad a nitratos por consumo de acelgas en España, verduras de hoja con alto contenido en nitratos, que no han sido objeto de evaluación por parte de EFSA dado que su consumo a nivel europeo es muy bajo y localizado.

A partir de los datos proporcionados por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) correspondientes a la concentraciones de nitratos en acelgas durante los años 2000-2009, de un total de 1.018 muestras, se observa una gran variabilidad en los contenidos, con una concentración mediana de 1.562 mg nitrato/kg acelgas, siendo superiores a los contenidos de nitratos en espinacas (mediana: 816 mg/kg) publicados por EFSA a nivel europeo.

Asumiendo que el consumo de acelgas en niños (de 3 meses a 1 año) es igual al de espinacas para niños de corta edad de la población europea, y aceptando como válido para niños de 1-3 años el consumo de acelgas en niños de 7-12 años del modelo de dieta española (AESAN, 2006), las estimaciones de exposición crónica por consumo sólo de acelgas en niños (de 1-3 años), considerando tres escenarios de concentración de nitratos, 1.562, 3.000 y 3.700 mg nitratos/kg (mediana, límite

máximo permitido de nitratos en espinacas frescas, y contenido P95, respectivamente), son inferiores a la IDA de 3,7 mg/kg p.c. establecida.

Las estimaciones de exposición aguda a nitratos obtenidas indican que en ninguno de los escenarios considerados, para los grupos de edad de 3, 6 y 9 meses, se superaría el valor de 15 mg/kg p.c./día, considerado como referencia para evitar niveles elevados de metahemoglobina en lactantes y niños de corta edad. Solo los niños de 12 meses, en casos de consumo extremo y concentraciones más elevadas, alcanzarían una exposición algo superior, aunque dado el pequeño porcentaje de muestras de acelgas que superan dichos contenidos, la probabilidad de manifestaciones tóxicas agudas sería muy baja.

En España, según los datos disponibles, este Comité aconseja que las recomendaciones de consumo para las espinacas se amplíen a las acelgas dada la importancia de su consumo y su mayor contenido en nitratos.

Se considera apropiado que se establezcan límites máximos de nitratos en acelgas de igual forma que se han fijado para espinacas.

Palabras clave

Nitratos, acelgas, lactantes, niños de corta edad, evaluación del riesgo.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to the risk assessment of infants and young children's exposure to nitrates resulting from the consumption of chard in Spain.

Abstract

The main via of exposure to nitrates for humans is through diet, as vegetables are the main dietary source making up between 80 and 85% of the daily intake. The relatively high levels found in vegetables such as rocket, lettuce and spinach is of note.

The European Food Safety Authority has recently assessed the possible effects on children of the nitrates found in certain leaf vegetables, and has concluded that the nitrate levels in lettuce do not pose a risk, although in the case of spinach, they indicate the possible existence of the risk of methemoglobinemia in children between 1-3 years old if they eat more than one portion per day (EFSA, 2010).

This report presents a risk assessment of the exposure of infants and young children to nitrates from eating chard in Spain, leaf vegetables with a high nitrate content, which have not been evaluated by the EFSA as consumption at European level is very low and localised.

Based on the data provided by the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) corresponding to nitrate concentrations in chard during the period 2000-2009, a significant variability in the content was detected in a total of 1,018 samples, with an average concentration of 1,562 mg nitrate/kg of chard, and with higher nitrate levels in spinach (median: 816 mg/kg) published by the EFSA at European level.

Assuming that the level of consumption of chard in children (from 3 months to 1 year old) is the same as that of spinach among young children in the European population, and accepting the

consumption of chard in children aged between 7-12 years from the Spanish diet model as valid for children between the age of 1 and 3 (AESAN, 2006), the estimations for chronic exposure due to eating chard among children (from 1-3 years), with three levels of nitrate concentration, 1,562, 3,000 and 3,700 mg nitrates/kg (median, maximum permitted nitrate level in fresh spinach, and P95 content, respectively), are lower than the ADI of 3.7 mg/kg b.w. of the established.

The estimations of acute exposure to nitrates indicate that in none of the cases considered, for the age groups of 3, 6 and 9 months, is the value of 15 mg/kg b.w./day exceeded, considered as a reference to prevent high levels of methemoglobin in infants and young children. Only 12 month old children, in cases of extreme consumption and very high concentrations, would reach a higher exposure, although given the low percentage of chard samples that exceeded these content levels, the probability of acute toxicity would be very low.

In Spain, according to available data, this Committee recommends that consumption levels for spinach be extended to chard given the significant levels of consumption and the higher nitrate content. The establishment of maximum nitrate levels in chard as exist for spinach is considered suitable.

Key words

Nitrates, chard, infants, young children, risk assessment.

Introducción

Los nitratos están presentes en el medioambiente, por lo que aparecen en el aire, los alimentos (fundamentalmente hortalizas y frutas) y el agua. Esta presencia tiene lugar como consecuencia del denominado ciclo del nitrógeno, según el cual el nitrógeno es fijado por las bacterias como nitrato antes de su uso en la síntesis de proteínas en las plantas. También se utilizan como fertilizantes y aditivos alimentarios.

Las fuentes de exposición humana a nitratos son: formación endógena y exposición exógena a través de la dieta y a partir de fuentes no dietéticas. De ellas, la principal vía de exposición en humanos a los nitratos es a través de la dieta, siendo las fuentes principales los vegetales, las conservas de carne y el agua de bebida. En este sentido, se considera que las hortalizas son la principal fuente dietética de nitratos, proporcionando entre el 80 y 85% de la ingesta diaria (Gangolli et al., 1994) (van Velzen et al., 2008). No obstante, esta ingesta diaria de nitratos depende de diversos factores como pueden ser el estilo de vida, factores de tipo cultural o la localización geográfica (JECFA, 1995).

Los contenidos de nitratos en las hortalizas varían ampliamente (entre 1 y 10.000 mg/kg) dependiendo del tipo y su fuente, así como de las condiciones de cultivo y almacenamiento (JECFA, 1995). Destacan las concentraciones relativamente elevadas encontradas en hortalizas, como rúcula, lechuga y espinacas. Por ejemplo, en el caso de las verduras de hoja se han descrito en algún caso contenidos de nitratos superiores a los 4.500 mg/kg (Tabla 1).

Verdura de hoja	Contenido medio (mg/kg)	Verdura de hoja	Contenido medio (mg/kg)
Rúcula	4.677	Endibia belga	1.465
Amaranto	2.167	Lechuga	1.324
Hierba de los canónigos	2.104	Lechuga romana	1.105
Mezcla de lechugas	2.062	Espinacas	1.066
Lechuga mantecosa	2.026	Lechuga iceberg	875
Remolacha	1.852	Diente de león	605
Acelga	1.690	Escarola	523
Lechuga rizada	1.601	Achicoria	355
Lechuga hoja de roble	1.534	Berro	136

Fuente: (EFSA, 2008).

En el caso de los nitritos, la vía exógena aporta entre el 11 y el 41%, dada su baja concentración en hortalizas frescas y frutas (1-20 mg/kg). El metabolismo de los nitratos y, fundamentalmente, la reducción de los nitratos secretados por la saliva, hace que la vía principal de exposición humana a nitritos sea endógena (Thomsom, 2004) (Greer y Shannon, 2005) (EFSA, 2008).

Los nitratos han sido objeto de sucesivas evaluaciones tanto por parte del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) (JECFA, 1995, 2002, 2003), como del Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF) (SCF, 1992), y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (EFSA, 2008, 2010). Según la evaluación de EFSA (2008) sobre los riesgos derivados de la presencia de

nitratos en vegetales, tras considerar diferentes escenarios de exposición que combinaban una serie de patrones de consumo y las concentraciones de nitratos en varios tipos de vegetales, se demostró como elemento crítico de la exposición, el tipo concreto de verdura y su contenido en nitratos, más que la cantidad de verduras consumidas.

Recientemente, EFSA (2010) ha evaluado los posibles efectos en niños de los nitratos contenidos en algunas verduras de hoja como las espinacas y la lechuga, dado que son las más consumidas en Europa. Entre sus conclusiones se destaca que los contenidos de nitratos en lechuga no representan un riesgo. Sin embargo, en el caso de las espinacas, se indica la posible existencia de riesgo de metahemoglobinemia en niños de 1-3 años si el consumo de éstas excede de una ración diaria. Además, en lactantes el consumo de espinacas cocinadas es más probable que el de lechuga.

No obstante, en España los niños también consumen acelgas. Las acelgas son verduras de hoja con alto contenido en nitratos. Sin embargo, no han sido objeto de evaluación por parte de EFSA dado que su consumo a nivel europeo es muy bajo y localizado. Asimismo, en la actualidad no existe normativa comunitaria alguna que fije contenidos máximos de nitratos en acelgas (Tabla 2).

Tabla 2. Contenidos máximos de nitrato establecidos por el Reglamento (CE) Nº 1881/2006

Producto alimenticio		Contenido máximo (mg NO ₃ /kg)	
1.1	Espinacas frescas (<i>Spinacia oleracea</i>)	Recolectadas entre el 1 de octubre y el 31 de marzo	3.000
		Recolectadas entre el 1 de abril y el 30 de septiembre	2.500
1.2	Espinacas en conserva, congeladas o ultracongeladas	2.000	
1.3	Lechuga fresca (<i>Lactuca sativa</i> L.) (lechugas de invernadero y cultivadas al aire libre) excepto las lechugas mencionadas en el punto 1.4	Recolectadas entre el 1 de octubre y el 31 de marzo: cultivadas en invernadero	4.500
		Recolectadas entre el 1 de octubre y el 31 de marzo: cultivadas al aire libre	4.000
		Recolectadas entre el 1 de abril y el 30 de septiembre: cultivadas en invernadero	3.500
		Recolectadas entre el 1 de abril y el 30 de septiembre: cultivadas al aire libre	2.500
1.4	Lechugas del tipo "Iceberg"	Cultivadas en invernadero	2.500
		Cultivadas al aire libre	2.000
1.5	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	200	

Fuente: (UE, 2006).

Ante esta situación, y dada la ausencia de normativa a nivel europeo para las acelgas, la Dirección Ejecutiva de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha solicitado al Comité Científico que evalúe el riesgo de la exposición de los lactantes y niños de corta edad (niños menores de 1 año y hasta 3 años) a los nitratos por consumo de acelgas, con el objeto de poder establecer medidas de gestión de riesgo adecuadas.

Identificación del peligro

El nitrato (ión) es un compuesto inorgánico formado por un átomo de nitrógeno y tres átomos de oxígeno (NO_3^-), cuyo peso molecular es 62 g/mol. Forma sales con distintos cationes (Tabla 3).

Sales de nitrato	Fórmula química	Nº CAS	Usos (ejemplos)
Nitrato de sodio	NaNO_3	7631-99-4	Fertilizante, conservante en productos cárnicos, fabricación de cemento
Nitrato de potasio	KNO_3	7757-79-1	Fertilizante, conservante, producción de pólvora
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	6484-52-2	Fertilizante, fabricación de explosivos
Nitrato de calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	10124-37-5	Fertilizante, tratamiento aguas residuales, fabricación de hormigón
Nitrato de magnesio	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	10377-60-3	Fertilizante
Nitrato de plata	AgNO_3	7761-88-8	Antiséptico, desinfectante, cauterizante

Fuente: (IPCS, 1999).

El nitrato es un importante metabolito en el ciclo del nitrógeno. Se forma por oxidación de nitrito (NO_2^-) debido a la acción de las bacterias del género *Nitrobacter*. Es un componente natural de los suelos y vegetales, así como un metabolito usual en los mamíferos. Su presencia en suelos y aguas superficiales se debe a la mineralización de la materia orgánica y al uso de fertilizantes (IPCS, 1999).

En el caso de las hortalizas se destaca la capacidad de los nitratos para acumularse, siendo sus contenidos variables dependiendo del tipo de hortaliza. Así, por ejemplo, las verduras de hoja pueden tener contenidos elevados de nitratos. El contenido de nitratos depende de diversos factores (Meah et al., 1994) (Thomsom, 2004) (EFSA, 2008) como son:

- Características del suelo. La acumulación de nitratos va a depender del tipo de suelo y de su contenido en minerales. Dado que los nitratos se mueven por convección desde el suelo a la superficie de la raíz, la escasez de agua puede limitar este transporte. Asimismo, el exceso de agua puede provocar la dilución de los nitratos en el suelo restringiendo así el crecimiento de la planta y provocando la pérdida de nitratos por desnitrificación.
- Aplicación de fertilizantes. Por ejemplo, la agricultura intensiva podría llevar al empleo de elevadas cantidades de fertilizantes, los cuales son fuentes de nitratos.
- Intensidad de la luz solar. Es un factor clave y determinante de las concentraciones de nitrato en las verduras de hoja. La alta irradiación en verano tiende a provocar la reducción del contenido de nitratos, y también las mayores tasas de crecimiento coinciden con periodos de irradiación elevada y temperaturas cálidas (Kanaan y Economakis, 1992). Por ejemplo, las verduras cultivadas en los países del norte de Europa tienen un mayor contenido de nitrato, en comparación con países del sur de Europa, puesto que están expuestas a una menor cantidad de luz solar. En el caso de hortalizas y verduras cultivadas en invernaderos, los contenidos de nitratos son mayores debido a la baja intensidad de la luz y a la alta mineralización (Gangolli et al., 1994).

- Condiciones de almacenamiento. Los contenidos de nitratos en hortalizas frescas pueden disminuir durante el almacenamiento a temperatura ambiente. Por otro lado, las concentraciones de nitritos suelen ser muy bajas y se pueden incrementar durante el almacenamiento dependiendo de las diferentes especies de hortalizas, la acción endógena específica de la enzima *nitrato reductasa* o la contaminación bacteriana. En el caso de almacenamiento en refrigeración (7 días a 5 °C) los contenidos de nitratos no se modifican lo que implica la inactivación de la *nitrato reductasa* así como la prevención de la actividad bacteriana.
- Procesado. Los nitratos son solubles en agua, por tanto durante el lavado de las verduras de hoja se puede producir una disminución del 10-15% en los contenidos de nitratos. El pelado de tubérculos y frutas puede disminuir los contenidos de nitratos entre un 34-61% (Dejonckheere et al., 1994).
- Tipo de cocinado. La distribución de los nitratos en las hortalizas no es homogénea. Por ejemplo, en las lechugas y las espinacas, la eliminación del tallo y el nervio de las hojas puede dar lugar a una disminución del 30 al 40% del contenido de nitratos (Dejonckheere et al., 1994). Asimismo, diversos autores indican que el contenido de nitratos en hortalizas puede reducirse, dependiendo de la hortaliza, entre el 16 y el 79% cuando se cuecen en agua (Abo Bakr et al., 1986) (Schuster y Lee, 1987) (Dejonckheere et al., 1994). Dada la tendencia actual hacia el consumo de alimentos frescos, en particular de diferentes variedades de verduras de hoja, EFSA en sus opiniones ha adoptado un enfoque conservador, de forma que no considera las potenciales disminuciones en los contenidos de nitratos debidas al procesado y cocinado en los cálculos de exposición iniciales, aunque pueden tenerse en cuenta como factores mitigantes en diversos escenarios de consumo de vegetales variados (EFSA, 2008).

Caracterización del peligro

1. Absorción, distribución, metabolismo y excreción

Los nitratos procedentes de las hortalizas, tanto frescas como cocinadas, se absorben de forma eficaz dando lugar a una biodisponibilidad cercana al 100% (van Velzen et al., 2008). Una vez ingeridos, los nitratos se absorben rápidamente en la región proximal del intestino delgado y, posteriormente, se distribuyen a través de la sangre de tal forma que en humanos los contenidos más altos de nitratos se encuentran en el suero, la saliva y la orina (JECFA, 2003). En este sentido, Bartholomew y Hill (1984) destacan que el 65-70% del nitrato administrado por vía oral se excreta por la orina.

Una vez distribuidos, los nitratos son activamente secretados desde la sangre a la saliva, tal y como se ha podido observar tanto en humanos como en varios tipos de animales de experimentación (a excepción de las ratas). Así, en el caso de los humanos aproximadamente el 25% de los nitratos ingeridos se secretan en la saliva. A su vez, de ese 25% de nitratos secretados, el 20% se reduce a nitritos debido a la presencia en la base de la lengua de una población estable de bacterias reductoras de nitratos (Gangolli et al., 1994) (JECFA, 2003), de forma que en individuos normales aproximadamente el 5-7% del nitrato ingerido puede detectarse como nitrito en la saliva (EFSA, 2008).

Los nitratos pueden ser reducidos a nitritos por la acción de las bacterias entéricas y por la actividad de la enzima *nitrato reductasa* en mamíferos, puesto que muchos de los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal muestran esta actividad. No obstante, se indica que el lugar donde esta reducción es mayor varía en función de la especie, su colonización microbiana y la absorción de nitratos.

Los nitritos contenidos en la saliva, en las condiciones ácidas del estómago, se transforman rápidamente en ácido nitroso, que se descompone en óxidos de nitrógeno, como óxido nítrico (NO); paralelamente, se produce la síntesis endógena de NO en el ciclo de la urea a partir de L-arginina, a través de la enzima *NO-sintetasa* (NOS). En condiciones fisiológicas, como se ha comentado, la mayoría del nitrato absorbido se excreta por orina, existiendo de todos modos una reabsorción selectiva en riñón, junto con recirculación biliar y salivar (EFSA, 2008).

2. Toxicidad

El nitrato *per se* es relativamente poco tóxico en humanos. No obstante, sus metabolitos y productos de reacción formados en el cuerpo humano (por ejemplo: nitrito, óxido nítrico y compuestos N-nitroso) se asocian a algunos efectos perjudiciales para la salud como metahemoglobinemia y carcinogénesis, siendo además el porcentaje normal de conversión de nitratos a nitritos del 5-7%, aunque puede llegar al 20% en algunos casos (JECFA, 1995, 2002) (EFSA, 2008).

Tal y como se ha indicado anteriormente, los nitratos han sido objeto de sucesivas evaluaciones tanto por parte del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios como de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. En dichas evaluaciones se indica como primer aspecto importante la necesidad de que las especies animales utilizadas se comporten de forma similar a los humanos en lo que se refiere a la toxicocinética de los nitratos y su conversión a nitritos (JECFA, 2002). Por ejemplo, los estudios en animales relativos al metabolismo y la toxicocinética de los nitratos han confirmado que las ratas no son un buen modelo animal, dado que no muestran un transporte de nitratos a través de su saliva y, por tanto, la conversión de nitratos en nitritos es limitada.

Además, se ha considerado que para llevar a cabo dicha evaluación se debe tener en cuenta tanto la toxicología de los nitratos como de los nitritos y los compuestos N-nitroso.

Toxicidad oral aguda y subcrónica

Los estudios llevados a cabo permiten observar que la toxicidad oral aguda de los nitratos en animales es generalmente baja, con valores para la LD_{50} que pueden oscilar entre los 300 mg/kg p.c. (peso corporal) en cerdos hasta los 6.250 mg/kg p.c./día en el caso de los ratones. Asimismo, se ha observado que en humanos adultos la dosis letal oral es de 330 mg/kg p.c. (Walker, 1990) (FAO/WHO, 1996), por lo que la sensibilidad humana, en cuanto a toxicidad aguda, es similar a la del cerdo.

En el caso del nitrito de sodio, los resultados observados indican que su toxicidad es muy superior a la del nitrato de sodio, con valores para la LD_{50} que oscilan entre 180 mg/kg p.c. (en el caso de las ratas) y 214 mg/kg p.c. (en ratones) (EFSA, 2008).

Metahemoglobinemia

Tal y como se ha indicado, la toxicidad aguda de los nitratos se atribuye principalmente a su reducción a nitritos, los cuales provocan la oxidación de la hemoglobina (Hb) de los hematíes a metahemoglobina (MHb), produciendo la denominada metahemoglobinemia. En circunstancias normales, los recién nacidos a término mantienen una concentración de MHb circulante de un 2%, mientras que en los prematuros es de un 2-3% (Greer y Shannon, 2005). En adultos el valor es < 2% (Gómez Lumbreras et al., 2008).

En el caso de los lactantes, esta enfermedad, también denominada "síndrome del niño azul", se caracteriza por la aparición de una coloración gris-azulada en la piel como consecuencia de un contacto con sustancias oxidantes o por situaciones diversas como causas alimentarias, genéticas, etc. (Herranz y Clerigué, 2003).

La metahemoglobinemia se produce cuando la velocidad de oxidación de la Hb a MHb excede la capacidad de la enzima *NADH-citocromo b5 metahemoglobina reductasa* de reducir la MHb de nuevo a Hb (Sánchez-Echaniz et al., 2001) (Pérez-Caballero et al., 2005), o cuando hay déficit de esta enzima (metahemoglobinemias congénitas) (Da-Silva et al., 2003) (Laporta Báez et al., 2008).

Según destacan varios autores, en el caso de los lactantes la mayor incidencia de metahemoglobinemia se observa en menores de 4-6 meses, especialmente en lactantes menores de 3 meses, debido a diversos factores como: elevada proporción de hemoglobina fetal, la cual posee una mayor susceptibilidad a ser oxidada a MHb por exposición a nitritos; pH gástrico elevado que favorece el crecimiento de bacterias nitrato-reductoras y, por tanto, una mayor transformación intestinal de nitratos en nitritos, que puede conducir a gastroenteritis que de forma concomitante incrementa la formación de nitritos; una actividad 40-50% menor de la enzima *NADH-citocromo b5 metahemoglobina reductasa* (ATSDR, 2004) y un riesgo mayor de infecciones intestinales (Savino et al., 2006). No obstante, también se indica que esta susceptibilidad desaparece a partir de esta edad, dado que los niveles enzimáticos son similares a los de los adultos y ya no hay prácticamente hemoglobina fetal (Herranz y Clerigué, 2003) (Greer y Shannon, 2005) (Gómez Lumbreras et al., 2008).

La formación de MHb provoca que los hematíes sean incapaces de captar oxígeno, cederlo a los tejidos y transportar dióxido de carbono, lo que puede originar hipoxia tisular y cianosis. La gravedad del cuadro clínico dependerá de la concentración de MHb, de tal forma que a concentraciones de MHb inferiores al 20% (10-15%), aparece la cianosis como primer síntoma (cianosis central en tronco, labios y mucosas, generalmente en placas) (Knobeloch et al., 2000) (Herranz y Clerigué, 2003) (Laporta Báez et al., 2008). No obstante, Greer y Shannon (2005) indican la posibilidad de que en lactantes con bajas concentraciones de Hb los primeros síntomas puedan aparecer con concentraciones de MHb del 3%. A concentraciones de MHb superiores al 20%, se produce un incremento de la cianosis mucocutánea, irritabilidad, taquipnea y alteración del estado mental. En los casos más graves tiene lugar la aparición de acidosis metabólica, arritmias cardíacas, coma y convulsiones generalizadas (Laporta Báez et al., 2008) (Herranz y Clerigué, 2003) (Gómez Lumbreras et al., 2008). En este sentido, algunos autores señalan que concentraciones de MHb superiores al 50% ocasionan hipoxemia grave y depresión del Sistema Nervioso Central, mientras que una MHb mayor del 60-70% puede provocar la muerte (Alonso Vega et al., 2007) (Gómez Lumbreras et al., 2008).

Estos síntomas también dependen de las condiciones clínicas previas, destacándose la aparición de una mayor sintomatología de la esperada, con cifras de MHb relativamente bajas, en pacientes con insuficiencia respiratoria o cardíaca, anemia o acidosis (Alonso Vega et al., 2007). Otros factores que pueden influir en la formación de MHb son la exposición a una serie de medicamentos, incluyendo anestésicos locales tópicos, nitrato de plata, acetaminofeno, sulfonamidas, valproato sódico, etc.

Los estudios que relacionan la formación de MHb en lactantes y niños de corta edad por consumo de verduras y de alimentos preparados para niños que contienen verduras como espinacas, zanahorias,

etc., no son abundantes, aunque se han publicado diferentes casos individuales (Sander y Jacobi, 1967) (Hack et al., 1983) (Greer y Shannon, 2005). Por ejemplo, se ha registrado un caso de elevada MeHb (25%), unido a taquicardia supraventricular y cianosis perioral en un niño de 6 meses tras haber consumido un puré de verduras variadas, que había sido preparado cinco días antes y mantenido a temperaturas de refrigeración (Bryk et al., 2003).

En nuestro país, en los últimos años, continúan presentándose casos de metahemoglobinemia, siendo la causa principal el consumo de purés de verduras elaborados en el hogar y almacenados en condiciones no apropiadas, con contenidos elevados de nitrito, o por reconstitución de la fórmula infantil con agua procedente de la cocción de verduras. Si bien los contenidos de nitritos en verduras frescas no dañadas, son generalmente muy bajos, éstos se incrementan durante el almacenamiento, por la reducción de nitratos y disminución del contenido de agua, acelerándose el proceso cuando se preparan en purés (Chung et al., 2004).

Sánchez-Echaniz et al. (2001) informaron de casos de metahemoglobinemia (10-58% de MHb) en niños de meses de edad tras la ingestión de purés de verduras variadas preparadas con antelación y conservadas en el frigorífico durante 12-27 horas. Las acelgas eran un componente común, siendo de los vegetales con contenidos más elevados en nitratos (media: 3.200 mg/kg). Más recientemente, Gómez-Lumbreras et al. (2008) han registrado un caso similar, de un lactante de 7 meses (MHb 21%) con cianosis periférica y palidez cutáneo mucosa, que había ingerido un puré de acelgas elaborado el día anterior. Tras eliminar la fuente de exposición, el cuadro clínico se resolvió en 72 h. Otros autores (Alonso Vega et al., 2007) (Laporta Báez et al., 2008) han informado de casos de metahemoglobinemia en niños de 8-9 meses, que cursaron con un cuadro de cianosis labial y palidez en las extremidades, tras la ingesta de un puré de verduras (que contenía acelgas) o un puré de acelgas, que se habían mantenido fuera de la nevera durante varias horas antes de su ingesta. Por tanto, la conservación deficiente o prolongada de las verduras cocidas constituye un factor de riesgo metahemoglobinizante.

EFSA (2010) revisa las asociaciones existentes entre concentración de nitratos en aguas de bebida y niveles de MHb en niños, indicando que la metahemoglobinemia no es elevada cuando los contenidos de nitrato son inferiores a 100 mg/l.

Puesto que los nitratos, tras su reducción a nitritos, tienen el potencial de causar metahemoglobinemia, y ello puede ocurrir tras una única exposición, EFSA destaca que sería apropiado establecer una Dosis Aguda de Referencia (ARfD), con vistas a evaluar la seguridad de una exposición aguda a nitratos. Sin embargo, los datos disponibles procedentes de estudios experimentales en animales y casos de intoxicaciones en humanos no proporcionan aún una base adecuada para establecer dicha ARfD (EFSA, 2008). Sin embargo, según EFSA (2010), los datos disponibles hasta la actualidad indican que los niveles de MHb no son elevados en lactantes y niños de 3 meses cuando la exposición a nitratos, a través del consumo de agua de bebida y verduras, es inferior a 15 mg/kg p.c./día.

Genotoxicidad

En lo que respecta a los estudios de genotoxicidad, los resultados obtenidos indican que los nitratos no son en sí mismos genotóxicos. Asimismo, en el caso de los nitritos tampoco se han encontrado evidencias que permitan clasificarlos como genotóxicos (JECFA, 2002).

Toxicidad crónica. Carcinogenicidad

Desde el punto de vista toxicológico, los nitratos intervienen en la formación de nitrosaminas y, por tanto, existe el potencial cancerígeno (AESAN, 2008). La Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha realizado recientemente una evaluación de los nitratos y nitritos ingeridos en la dieta y los ha clasificado en la categoría 2A, que indica que probablemente son carcinógenos en humanos (IARC, 2010).

Los estudios de carcinogenicidad con nitratos fueron negativos a excepción de la administración de dosis extraordinariamente altas de nitratos y precursores nitrogenados. En este mismo sentido, los estudios epidemiológicos no han mostrado evidencias de la existencia de una asociación en humanos entre la exposición a nitratos a través de la dieta o agua de bebida y el riesgo de padecer cáncer (JECFA, 1995, 2002) (EFSA, 2008) (IARC, 2010). No obstante, en el caso del nitrito de sodio un estudio llevado a cabo en ratas y ratones ha puesto de manifiesto la posible existencia (*equivocal evidence*) de actividad carcinogénica (NTP, 2001). Según la IARC (2010) existen evidencias limitadas en humanos sobre la carcinogenicidad de nitritos presentes en los alimentos, estando asociados a un incremento de la incidencia de cáncer de estómago.

En el caso de los compuestos N-nitroso, no existen evidencias cuantitativas sobre la formación endógena de compuestos N-nitroso carcinogénicos a partir de los nitritos y compuestos N-nitrosables ingeridos en la dieta. Por tanto, no se ha considerado apropiado evaluar el riesgo de los nitritos en base a la formación endógena de estos compuestos N-nitroso (JECFA, 2002). Además, cuando los nitratos se consumen en una dieta normal y variada que contenga verduras, de forma concomitante se ingieren otras sustancias bioactivas que actúan como antioxidantes (vitaminas C y E, por ejemplo), que son eficientes inhibidores de la formación de MHB y que pueden inhibir en parte la formación endógena de nitrosaminas (EFSA, 2010).

Tomando como referencia un NOEL (*Non Observed Adverse Effects Level*) de 370 mg/kg p.c./día, expresado como ión nitrato, y un factor de seguridad de 100, JECFA (1995) estableció una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 5 mg/kg p.c. expresada como nitrato de sodio ó 3,7 mg/kg p.c. expresada como ión nitrato. Esta IDA ha sido objeto de reevaluación, en su cincuenta y nueve sesión, en base a los nuevos estudios disponibles, concluyéndose que los efectos tóxicos observados son consecuencia de la conversión *in vivo* de los nitratos a nitritos, no aportándose datos suficientes para modificar la IDA asignada. Asimismo, se estableció para los nitritos una IDA de 0,07 mg/kg p.c. expresada como ión nitrito (JECFA, 2002), destacando su capacidad para causar metahemoglobinemia. Posteriormente, el Panel de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM) de EFSA (EFSA, 2008) concluyó que en ausencia de nuevos datos toxicológicos significativos, no existía la necesidad de reconsiderar dichas IDA.

Evaluación de la exposición

1. Contenidos de nitratos en verduras

El Panel de Contaminantes de la Cadena Alimentaria de EFSA ha publicado en 2008 una evaluación científica sobre los contenidos de nitratos en vegetales, donde se comparaban los riesgos y beneficios de la exposición a los nitratos en vegetales (EFSA, 2008), cuyos datos más significativos se desarrollan a continuación.

En dicha opinión, el Panel recibió y evaluó 41.969 datos de concentraciones de nitratos, procedentes de 20 Estados miembros y de Noruega, pertenecientes a 92 variedades de vegetales diferentes. España participó aportando 3.811 datos de contenidos de nitratos en vegetales. Se constató una enorme variación en las medianas de las concentraciones de las verduras, con contenidos tan bajos como 1 mg/kg en el caso de guisantes y coles de Bruselas, hasta los 4.800 mg nitratos/kg cuantificados en rúcula, siendo las verduras de hoja verde las que de forma consistente contenían más nitratos (EFSA, 2008).

La mayoría de los vegetales tenían un contenido (mediana) de 392 mg nitrato/kg, y las medianas de las concentraciones de los vegetales o grupos de vegetales que EFSA utilizó en los diferentes escenarios de exposición a nitratos fueron en orden ascendente: 106 mg nitrato/kg en patatas, 785 mg nitrato/kg en espinacas, 1.388 mg nitrato/kg para diversas variedades de lechuga y 4.800 mg nitrato/kg en rúcula. En su evaluación, el Panel también consideró los contenidos de nitrato (medianas) más elevados en determinadas zonas geográficas para las espinacas (1.745 mg/kg) y diversas variedades de lechuga (2.652 mg/kg).

Se comprobó la variabilidad de los contenidos de nitratos en las verduras debida a diferencias geográficas, por los factores ya expuestos, de forma que por ejemplo, las concentraciones de nitratos en lechugas producidas en el sur de Europa fueron inferiores en comparación con las cultivadas en el centro o norte de Europa.

Los contenidos de nitritos encontrados en los vegetales analizados fueron muy inferiores a los de nitratos, y no se considera que supongan una contribución directa importante a la exposición humana, en comparación con la formación endógena a partir de nitratos.

Posteriormente, en diciembre de 2010, EFSA ha publicado una declaración relativa a los posibles efectos en la salud de los niños por los nitratos contenidos en algunos vegetales, como las espinacas y la lechuga. En esta opinión, a partir de 13.391 datos de contenidos de nitratos en lechugas y 7.358 en espinacas, las medianas de las concentraciones de nitratos fueron en lechugas 1.260 mg/kg y en espinacas 816 mg/kg (EFSA, 2010).

2. Contenidos de nitratos en acelgas

En la opinión científica de EFSA de 2008, la concentración media de nitratos en acelgas (n=666) fue de 1.690 mg/kg, siendo la mediana del mismo orden, aunque un poco inferior, 1.510 mg nitrato/kg.

En este informe del Comité Científico de la AESAN se han utilizado datos proporcionados por la propia AESAN, correspondientes a las concentraciones de nitratos en acelgas (mg nitrato/kg muestra) durante los años 2000-2009. Se recogieron un total de 1.018 resultados procedentes del territorio nacional, derivados de los programas de control de las comunidades autónomas. Sólo existen 19 casos (1,8% del total) en los que los valores se encuentran por debajo de los límites de detección (LOD) y/o cuantificación (LOQ), por lo que van a tener poco impacto sobre los resultados globales estadísticos, y se asume, siguiendo los criterios de EFSA (2008, 2010) un valor numérico igual al LOD/LOQ.

Aunque no existe una legislación europea para los contenidos de nitratos en acelgas, sabiendo que igual que ocurre en las espinacas, hay diferencias estacionales para el contenido en nitratos y que puede variar en producto fresco y congelado, para los cálculos estadísticos básicos, los datos se agrupan según:

- Acelgas frescas.
 - Recolectadas en verano (1 abril-30 septiembre).
 - Recolectadas en invierno (1 octubre-31 marzo).
- Acelgas en conserva, congeladas, ultracongeladas.

En la Tabla 4 se resume la estadística básica de las muestras analizadas, recogiendo para cada uno de los grupos considerados los valores de P5 (Percentil), P95, media y desviación estándar, mediana y valor máximo. Para ello, se han tenido en cuenta las siguientes consideraciones:

1. Los datos de fecha de recolección, verano/invierno, no siempre están disponibles. Por ello, se han utilizado dos opciones a la hora de presentar los datos: de forma total, sin especificar verano/invierno, y de forma separada, considerando el periodo de recolección verano/invierno cuando así se especifica en la base de datos.
2. La separación frescas/congeladas ha sido posible ya que esa información sí suele venir indicada.

No obstante, como a nivel de consumo, no se diferencia entre el momento de recolección (verano/invierno) ni la forma de cultivo (aire libre/invernadero) y tampoco el tratamiento de la muestra (fresca/congelada, etc.), los datos que se van a utilizar son los contenidos totales de nitrato (mg/kg), sin ningún tipo de diferenciación.

Categoría de alimentos	N	<LOD	P5	Mediana	Media (SD)	P95	Max
Acelgas frescas (verano)	424	11	102,75	1.420,00	1.606,03 (1.188,89)	3.706,65	6.634,73
Acelgas frescas (invierno)	232	0	231,00	1.904,00	1.977,02 (1.096,75)	3.909,47	4.770,00
Total acelgas frescas	751	11	121,00	1.597,00	1.735,71 (1.156,09)	3.780,00	6.634,73
Total acelgas congeladas, refrigeradas, conserva	137	1	372,00	1.386,00	1.485,76 (778,74)	2.701,76	5.119,00
Total acelgas	1.018	19	172,02	1.562,00	1.691,12 (1.110,46)	3.700,00	6.634,73

Se observa una gran variabilidad en las concentraciones aportadas, con un intervalo de contenidos muy amplio, por lo que en los cálculos de exposición los escenarios se basarán en las medianas de los contenidos de nitrato, asumiendo que un consumidor escoge de forma aleatoria acelgas del mercado, según la metodología usual seguida por EFSA (2008). Atendiendo al contenido (mediana) obtenido de 1.562 mg nitratos/kg en las muestras analizadas en nuestro país durante 2000-2009 de los datos aportados por AESAN, éste concuerda con la concentración mediana de 1.510 mg/kg reportada por EFSA (2008) a nivel europeo.

Teniendo en cuenta el periodo de recolección (verano/invierno) en los casos especificados en la base de datos, se observa un mayor contenido de nitratos en las acelgas recolectadas en invierno (1.904 mg nitrato/kg) en comparación con la estación estival (1.420 mg nitratos/kg) lo cual corrobora la influencia que tiene la intensidad de la luz solar sobre los contenidos de nitratos en este tipo de verdura de hoja.

Indicar que si bien no existen límites máximos permitidos de nitratos en acelgas, en los datos evaluados en este informe, 126 muestras del total de acelgas (12,4%) superan el contenido máximo permitido de nitratos en espinacas de 3.000 mg/kg, y 69 muestras (6,8%) tienen contenidos superiores a 3.500 mg/kg, límite máximo propuesto que actualmente está siendo debatido a nivel europeo (EFSA, 2010).

Los datos incluidos en la Tabla 5, en la que se comparan los contenidos de nitratos en acelgas y espinacas según diversas fuentes, indican que el contenido de NO_3^- en acelgas es del mismo orden que en espinacas. Según los datos proporcionados por AESAN (2000-2009) para este informe, el contenido de nitratos en acelgas (mediana) es aproximadamente un 90% superior al de las espinacas evaluadas por EFSA en 2010. En consecuencia, teniendo en cuenta que las acelgas son objeto de consumo en España parece lógico que se considere necesaria la evaluación del riesgo que supone el consumo de acelgas al igual que se ha hecho con las espinacas, aunque sólo sea a nivel nacional.

Tabla 5. Comparativa de contenidos de nitratos (mg/kg) en espinacas y acelgas, según diferentes fuentes

Muestra	Fuente	N	Mediana	Media	Rango ó P5/P95
Espinacas	AESAN (2006)**	367	1.153	1.368	14-5.837
Espinacas	AESAN (2007)**	333	1.068	1.261	14-5.712
Espinacas	(Menard et al., 2008)	266	No consta	1.681,7	?-8.700
Espinacas	(EFSA, 2008)	6.657	785	1.066	64/3.048 (P5/P95)
Espinacas	(EFSA, 2010)*	7.358	816	1.092	?-10.470
Acelgas	AESAN (2006)**	143	1.454	1.628	80-6.634
Acelgas	AESAN (2007)**	142	1.400	1.548	50-4.690
Acelgas	(Menard et al., 2008)	7	No consta	1.354	?- 3.500
Acelgas	(EFSA, 2008)	666	1.510	1.690	178/3.685 (P5/P95)
Acelgas	AESAN (2000-2009)	1.018	1.562	1.691	10-6.634

(*) Muestras procedentes de 21 países.

(**) Resultados de los controles de nitrato en hortalizas durante los años 2006 y 2007. Informe interno AESAN.

3. Consumo de acelgas e ingesta de nitratos procedente de dicho consumo en niños menores de 1 año y hasta 3 años

El consumo de un alimento es una pieza fundamental para establecer la exposición a un determinado contaminante. El problema surge cuando se trata de determinar la exposición de grupos específicos de población (en este caso niños de 0-3 años), ya que lo más habitual es disponer de datos de consumo en población adulta. En este caso, además, la mayoría de las bases de datos disponibles no recogen

el consumo de acelgas, ya que como se ha dicho anteriormente su consumo no es generalizado en Europa.

En la reciente opinión de EFSA (2010) sobre riesgos para la salud en niños derivados de la presencia de nitratos en vegetales, no se incluye el grupo de edad de niños menores de 3 meses por no ser consumidores de verduras. De forma análoga, en este informe del Comité Científico, se van a considerar los siguientes grupos de edad: niños de 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses y de 1-3 años.

En la Tabla 6 se recogen los datos disponibles sobre el consumo de acelgas y espinacas según distintas fuentes.

Tabla 6. Consumo de acelgas y espinacas para disitintos grupos de edad (gramos/persona/día)					
Consumo (g/persona/día)					
Niños (Peso medio: 34,48 Kg. Edad: 7-12 años)					
Toda la población	Sólo consumidores				Fuente
Media±SD	% consumidores	Media± SD	P97,5		
Acelgas	2,61±10,69	10,19	25,62±23,17	71,04	AESAN. España (1)
Espinacas	2,69±11,3	8,19	32,84±23,95	79,77	AESAN. España (1)
Adultos (Peso medio: 68,48 Kg. Edad: ≥17años)					
Toda la población	Sólo consumidores				Fuente
Media±SD	% consumidores	Media±SD	P97,5		
Acelgas	5,21±18,94	9,43	55,26±32,28	118,53	AESAN. España (1)
Espinacas	4,87±19,31	9,34	52,17±39,18	128,96	AESAN. España (1)
Adultos (Edad: >18 años)					
Toda la población	Sólo consumidores				Fuente
Media					
Acelgas	4,74	-			CAPV (2)
Espinacas	2,16	-			CAPV (2)
Niños (Edad: 3-14 años)	Adultos (Edad: >15 años)				Fuente
Media	Media				
Acelgas	0,2	0,6			Francia (3)
Espinacas	3,2	4,1			Francia (3)
Adultos (Peso medio: 60 kg)					
Toda la población	Sólo consumidores				Fuente
Media (g/día)					
Acelgas	2,2	-			GEMS-Food (4)
Espinacas	5	-			GEMS-Food (4)
Adultos (Peso medio: 60 kg)					
Toda la población	Sólo consumidores				Fuente
Media (g/kg/día)	Media (g/kg/día)				
Acelgas	-	9,03			GEMS-Food (Países Bajos) (4)
Espinacas	-	13,01			GEMS-Food(Países Bajos) (4)
Niños ≥ 6 años (Peso medio: 16,5 kg)					
Toda la población	Sólo consumidores				Fuente
Media (g/Kg/día)	Media (g/Kg/día)				
Acelgas	-	2,5			GEMS-Food (Francia) (4)
Espinacas	-	29,60			GEMS-Food (S. Africa) (4)

(1) Modelo de dieta española para la determinación de la exposición del consumidor a sustancias químicas (AESAN, 2006). (2) Estudio cuantitativo del consumo de alimentos en la CAPV (2008). (3) (Menard et al., 2008). (4) GEMS/FOOD *Regional Diets* (WHO, 2003).

De acuerdo con los datos del modelo de dieta española de la AESAN (AESAN, 2006), el consumo de acelgas es similar al de espinacas, tanto en la población general como en la de "sólo consumidores", en los dos grupos de población considerados (niños de 7-12 años y mayores de 17 años). No obstante, no se da información del consumo para niños menores de 7 años, grupo más sensible al que va dirigido esta evaluación.

En la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) el consumo de acelgas en adultos duplica el de espinacas (Gobierno Vasco, 2008), mientras que los datos disponibles de Francia indican un mayor consumo de espinacas respecto a las acelgas tanto en adultos como en niños (Menard et al., 2008); en este último estudio la edad de los niños osciló entre 3-14 años, fuera del intervalo que interesa en este informe.

Por su parte los datos del GEMS-Food (*Food Contamination Monitoring and Assessment Programme*) indican un consumo de acelgas en adultos idéntico al modelo de dieta que utiliza AESAN, mientras que el de espinacas es superior (casi el doble). En la misma fuente se encuentra el consumo de acelgas en Francia (P97,5) para "sólo consumidores" en niños mayores de 6 años, con un valor de 41,25 g/día. En el modelo de dieta en España (AESAN, 2006) ese mismo valor, para niños de 7-12 años es de 71,04 g/día.

En cuanto al consumo en niños, en el País Vasco se realizó un estudio en el año 2001 en el que se analizó la dieta de 282 niños de 8 a 12 meses. De éstos el 97,5% eran niños consumidores diarios de puré de verduras, con una ración media diaria de $260 \pm 9,1$ g. En el mismo estudio se observó que el puré medio que consumían estos niños tenía un contenido en acelga del 6%, lo que supone 15,6 g/día (Gobierno Vasco, 2003).

También resultan indicativos los datos recogidos en el informe de EFSA (2010), para evaluar la exposición aguda a nitratos, en cuanto al consumo de espinacas en los tres grupos de edad 1-3 años, 4-6 años y mayores de 7 años, cuyos valores se resumen en la Tabla 7. En la citada opinión se observa que los consumos, tanto la mediana (expuestos en la Tabla) como la media, son muy similares para los tres grupos de edad. De ello se desprende que según los datos disponibles para el consumo de acelgas en el modelo de dieta española (AESAN, 2006) para niños mayores de 7 años, esa misma cantidad podría asumirse para los niños de 1-3 años.

Tabla 7. Consumo de espinacas (gramos/día) en los distintos grupos de edad para una exposición aguda a nitratos

Edad	Peso (kg) ¹	Consumo espinacas (g/día)	Consumo espinacas (g/kg/día)	Fuente
3 meses	6,1	6,1-7,9	1,0-1,3	(EFSA, 2010) ²
6 meses	7,7	10,8-15,4	1,4-2,0	
9 meses	8,8	18,5-29,9	2,1-3,4	
12 meses	9,7	27,2-44,6	2,8-4,6	
1-3 años	14	44,2 (mediana)	3,0	(EFSA, 2010) ³
4-6 años	20	33,1 (mediana)	1,6	
≥ 7 años	35	46,6 (mediana)	1,2	

Adaptado de (EFSA, 2010).

¹El peso considerado coincide con los valores (mediana) para los distintos grupos de edad considerados por la OMS. ²Basándose en el estudio de Kersting et al. (1998), consideran que los niños de 3 meses hacen dos comidas al día que contienen espinacas y éstas representan 2/3 del peso de la comida. Para los niños de 6, 9 y 12 meses el contenido de espinacas en la comida sería del 50% y harían una comida con espinacas al día. Con esas asunciones el consumo (g/día) es el indicado en esta Tabla. Para la máxima exposición teórica (en niños de 12 meses) consideran dos comidas al día y el 100% de espinacas. ³Estos valores corresponden a "sólo consumidores". Sólo un 9,6% de los niños consumen espinacas. En el caso de 1-3 años N=266.

Sólo recientemente se ha dispuesto de información sobre consumo en niños de 0-3 años, tras el desarrollo de algunas bases de datos como EXPOCHI, que ya se ha utilizado en el informe de EFSA (2010). En éste, EFSA reconoce la escasez de datos de consumo de alimentos para niños menores de 12 meses por parte de los Estados miembros y, tras examinar los resultados de diversos estudios (Kersting et al., 1998), estima la exposición a nitratos de forma aguda, por consumo de espinacas en niños de 3-12 meses (Tabla 7), considerando dos escenarios, bajo y alto consumo de alimentos.

En resumen, si se asume que el consumo de acelgas es igual al de espinacas en la población infantil española y se utilizan para el consumo los mismos criterios que los usados por EFSA (2010) para niños de corta edad, los consumos de acelga para los distintos grupos de edad serían los que se recogen en la Tabla 7.

Para estimar la exposición dietética aguda a nitratos por consumo de acelgas en niños para distintos grupos de edad, de 3 meses a 3 años, se consideran por tanto dichos consumos de acelga (Tabla 7), y tres escenarios en relación a los contenidos de nitratos en la totalidad de las muestras de acelgas analizadas en nuestro país (AESAN 2000-2009) (Tabla 4): 1) la mediana de 1.562 mg/kg (parámetro usualmente utilizado en exposiciones crónicas), 2) un contenido de 3.000 mg/kg, que es el límite máximo permitido actualmente de nitratos en espinacas frescas (mayoría de muestras) y 3) un contenido de 3.700 mg/kg, correspondiente al P95 de los datos obtenidos en los contenidos de acelgas (peor escenario).

La Tabla 8 recoge dichas estimaciones, expresándose las exposiciones en mg nitrato/kg peso corporal por día.

Según las estimaciones realizadas, la exposición a nitratos por consumo de acelgas en niños lactantes y de corta edad (menores de 3 años) varía entre 1,6 y 7,2 mg/kg p.c./día (9,5 y 69,7 mg nitratos/persona/día) cuando se considera la concentración mediana de 1.562 mg nitratos/kg acelgas.

Incluso en niños de 12 meses se puede llegar, en el peor escenario, alto consumo de acelgas con una concentración de nitratos de 3.700 mg/kg (P95), a una exposición de 17,0 mg/kg p.c./día (133,8 mg nitratos/persona/día).

Se estima una posible exposición dietética de 13,8 mg/kg p.c./día a partir del consumo de acelgas en niños de 12 meses de edad, en el caso hipotético de que se fijara el contenido máximo de nitratos en acelgas, al igual que en espinacas, en 3.000 mg/kg, exposición idéntica a la ya estimada por EFSA (2010).

Las estimaciones anteriores no consideran la exposición a nitratos a partir del agua empleada en la reconstitución de las fórmulas para lactantes. Se considera que frecuentemente el agua contribuye de forma importante a la exposición de nitratos en niños. EFSA en sus dos opiniones (2008, 2010) no ha considerado el agua como fuente de exposición, al no tener información adecuada sobre contenidos de nitratos en aguas empleadas para preparar las fórmulas infantiles.

Las estimaciones de exposición aguda a nitratos en niños por consumo de acelgas considerando la concentración mediana de 1.562 mg/kg nitratos en acelgas obtenidas en este informe (1,6-7,2 mg/kg p.c./día) son aproximadamente el doble de las alcanzadas por consumo de espinacas evaluadas por EFSA en 2010, que oscilaron entre 0,8 y 3,8 mg/kg p.c./día, lo cual es debido al valor casi 50% inferior del contenido mediano de nitratos en espinacas (816 mg/kg de nitrato). El consumo de una única ración de espinacas conteniendo el nivel máximo permitido o superiores (3.500 mg/kg nitratos) resultó en una exposición próxima a 15 mg/kg p.c., similar a la obtenida por consumo de acelgas en el peor escenario.

Siendo la lechuga un componente menor en la dieta de los niños en las edades consideradas, en comparación con las espinacas y acelgas cocinadas, EFSA estimó una exposición total a través de la dieta en niños de 1-18 años que osciló entre 1,7 y 4,2 mg nitratos/kg p.c., considerando la mediana de consumo, y hasta de 16 mg nitratos/kg p.c. al nivel más elevado de consumo de lechuga, combinado con los datos de contenido de nitratos superiores (EFSA, 2010).

Los datos de consumos de la Tabla 7 representan al grupo de "sólo consumidores". Siguiendo con la hipótesis ya expuesta, los datos de consumo de acelgas en niños de 7-12 años (AESAN, 2006) podrían considerarse válidos para la población general de 1-3 años, con unos valores de 2,61±10,69 g/día (0,186 g/kg/día). Con esta suposición, la ingesta estimada de nitratos crónica en niños de 1-3 años por consumo exclusivo de acelgas (población general: consumidores + no consumidores) sería de 0,29, 0,56 y 0,69 mg/kg/día para las tres concentraciones de nitratos consideradas (1.562, 3.000 y 3.700 mg/kg), respectivamente.

En el caso de adultos, la exposición a nitratos de forma crónica, por consumo de 400 g de vegetales mixtos por día, considerando las concentraciones típicas medianas de nitrato, fue de 157 mg nitrato/día (EFSA, 2008). En niños lactantes y de corta edad, la exposición crónica mediana a nitratos (considerando el consumo de vegetales en general y otros alimentos) osciló entre 0,77 y 1,39 mg/kg p.c./día (EFSA, 2010).

Tabla 8. Estimaciones de la exposición dietética a nitratos en niños (3 meses-3 años) por grupos de edad, considerando varios escenarios a partir de diferentes contenidos en acelgas, y comparación con la IDA establecida (3,7 mg nitratos /kg p.c./día)

Sólo consumidores					Población general						
Edad*	Peso (kg)	Consumo		Exposición nitratos mg/kg p.c./día			Consumo		Exposición nitratos mg/kg p.c./día (%IDA)		
		acelgas (g/día) ¹	acelgas (g/kg/día) ¹	Contenidos nitratos (mg/kg)			acelgas (g/día) ²	acelgas (g/kg/día) ²	Contenidos nitratos (mg/kg)		
				1.562	3.000	3.700			1.562	3.000	3.700
3 meses	6,1	6,1-7,9	1,0-1,3	1,6-2,0	3,0-3,9	3,7-4,8	-	-	-		
6 meses	7,7	10,8-15,4	1,4-2,0	2,2-3,1	4,2-6,0	5,2-7,4	-	-	-		
9 meses	8,8	18,5-29,9	2,1-3,4	3,3-5,3	6,3-10,2	7,8-12,6	-	-	-		
12 meses	9,7	27,2-44,6	2,8-4,6	4,4-7,2	8,4-13,8	10,4-17,0	-	-	-		
1-3 años	14	44,2 (mediana)	3,15	4,9	9,4	11,6	2,61±10,69	0,186	0,29 (7,8%)	0,56 (15,1%)	0,69 (18,6%)

¹Se consideran dos niveles de ingesta de alimentos, uno bajo (media menos la desviación estándar) y alto (media más desviación estándar) (Kerstin et al., 1998) (EFSA, 2010). ²Modelo de dieta española (AESAN, 2006).

Caracterización del riesgo

De acuerdo con los datos obtenidos en la Tabla 8 de estimaciones de la ingesta de nitratos por consumo de acelgas, y teniendo en cuenta las suposiciones de ingestas estimadas en niños de 1-3 años para la población general, las estimaciones de exposición crónica por consumo sólo de acelgas en los tres escenarios contemplados (1.562, 3.000 y 3.700 mg/kg) son inferiores a la IDA de 3,7 mg/kg p.c., representando porcentajes de dicha IDA del 7,8%, 15,1% y 18,6%, respectivamente. Estos resultados apoyan los valores para el conjunto de la población por consumo de vegetales obtenidos por EFSA (2008), y en su opinión sobre los riesgos en lactantes y niños de corta edad por consumo de espinacas y lechuga (EFSA, 2010).

De forma paralela a la opinión de EFSA (2010), el interés fundamental de este informe son las estimaciones de exposición aguda por consumo de acelgas, ya que incluso aunque algunas estimaciones de exposición crónica a nitratos estuvieran próximas o excedieran ocasionalmente la IDA, ello no indicaría un riesgo para la salud *per se*, ya que la IDA para nitratos se deriva de estudios subcrónicos y crónicos.

La exposición aguda a nitratos, considerando la concentración mediana de los datos disponibles (1.562 mg/kg nitratos) y sólo a los consumidores, supone una ingesta diaria de 1,6-7,2 mg/kg p.c./día en los grupos de edad considerados. La exposición a nitratos en los otros dos escenarios (3.000 y 3.700 mg/kg nitratos) conduce a exposiciones más elevadas, entre 3,0-13,8 mg/kg p.c./día, y hasta de 17 mg/kg p.c./día, sin tener en cuenta otras fuentes de nitratos, tales como agua.

Siguiendo los criterios de EFSA (2010) en la caracterización del riesgo por exposición aguda a nitratos, se tomará 15 mg/kg/día como valor de referencia, ya que los datos disponibles indican que en exposiciones inferiores a dicho valor, los niveles de Mhb en lactantes y niños no son elevados. Dicha dosis, por tanto, no se superaría en ninguno de los escenarios considerados (1.562, 3.000 y 3.700 mg/kg nitratos) en los grupos de edad de 3, 6 y 9 meses, que son los que tienen mayor riesgo de sufrir metahemoglobinemia.

Sólo los niños de 12 meses, en casos de consumo extremo y concentraciones de 3.700 mg/kg de nitratos (P95), alcanzan una exposición de 17 mg/kg p.c./día, superando ligeramente los 15 mg/kg p.c. Teniendo en cuenta los datos suministrados por AESAN, solo el 6,8% de las muestras durante los años 2000-2009 tienen contenidos de nitratos superiores a 3.500 mg/kg, por ello, la probabilidad de manifestaciones tóxicas agudas sería muy baja.

Los consumos considerados en la ingesta diaria (Tabla 7) se basan en la asunción de que los niños de 12 meses consumen acelgas una vez al día como parte de una comida que contiene un 50% de acelgas, usando el mismo criterio que EFSA (2010) para las espinacas. En casos excepcionales se podría considerar que consumen dos comidas al día y que el contenido de acelgas sea el doble, considerando además un contenido de nitratos máximo de 3.000 mg/kg. Ello supondría una "máxima exposición teórica" de 55,3 mg/kg p.c./día, hasta tres veces superior a la dosis de 15 mg/kg p.c./día.

Con ese mismo razonamiento, para niños de 6 meses la "máxima exposición teórica" supondría 24 mg/kg p.c./día para una concentración de nitratos de 3.000 mg/kg y de 29,6 mg/kg p.c./día para una concentración de nitratos de 3.700 mg/kg.

En estos casos de "máxima exposición teórica" se superaría la concentración de 15 mg/kg/día y podría dar lugar a la aparición de metahemoglobinemia.

Incertidumbres

A lo largo del proceso de Evaluación del Riesgo de nitratos a través del consumo de acelgas se han detectado las siguientes incertidumbres:

- Analíticas:
 - a) No se especifica el método analítico utilizado por los diferentes laboratorios que aportan datos. Esta información es fundamental para valorar la fiabilidad de los resultados. En cuanto a los parámetros del método analítico se recogen algunos (recuperación e incertidumbre) pero es claramente insuficiente. Tampoco se especifica el LOD/LOQ del método, aunque de los datos aportados se puede deducir alguno de ellos. No siempre se indica el laboratorio donde se han realizado los análisis.
 - b) Representatividad de las muestras en cuanto a origen, diferencias regionales y estacionales (verano/invierno) y forma de cultivo (aire libre/invernadero).
- Influencia del procesado y/o cocinado sobre los contenidos de nitratos en las muestras procesadas.
- Límites máximos: no existen límites máximos establecidos para acelgas, por lo que se suelen utilizar los límites de espinacas, aunque generalmente los valores obtenidos para acelga son superiores.
- Ingesta: ausencia de datos de consumo de acelgas para la población objeto de estudio.

Además de las incertidumbres y limitaciones ya especificadas por EFSA (2010) relativas a la presencia de nitratos en verduras de hoja.

Recomendaciones de consumo

Algunas recomendaciones respecto al consumo de verduras de hoja son:

Los lactantes y niños con infecciones bacterianas gastrointestinales no deben consumir espinacas porque son más sensibles a los nitratos (EFSA, 2010).

Estas hortalizas deben prepararse en el momento del consumo y mantenerse congeladas en el caso de que vayan a ser consumidas en un intervalo superior a las 12 horas o más desde su preparación (EFSA, 2008), dado que una conservación inadecuada de estos alimentos cocinados puede dar lugar a una reducción de los nitratos a nitritos aumentando así el riesgo de metahemoglobinemia.

Asimismo, algunas instituciones como la Asociación Española de Pediatría, aunque no hacen referencia explícita al consumo de acelgas, recomiendan que la ingesta de verduras se realice a partir de los 6 meses en forma de puré, evitando los primeros meses las espinacas, col y remolacha, que pueden ser introducidas a partir de los 12 meses (AEP, 2002).

Conclusiones del Comité Científico

- De la evaluación de los datos de contenidos de nitratos en acelgas (durante los años 2000-2009) proporcionados por AESAN, se observa una gran variabilidad en los contenidos, con un valor de la mediana de 1.562 mg nitrato/kg acelgas, y de 3.700 mg/kg al P95, siendo superiores a los contenidos de nitratos en espinacas (mediana 816 mg/kg), a nivel europeo publicados por EFSA (2008). Aunque no existen límites máximos permitidos de nitratos en acelgas, 126 muestras (12,4%) superan el contenido máximo permitido de 3.000 mg/kg en espinacas, y 69 muestras (6,8%) los 3.500 mg nitratos/kg.
- Para una evaluación más precisa del riesgo a nitratos asociado al consumo de acelgas en lactantes y niños de corta edad (1-3 años), grupo más sensible de sufrir metahemoglobinemia tras exposición aguda, sería conveniente disponer de datos específicos relativos a su consumo.
- Asumiendo que el consumo de acelgas en niños de 3 meses a 1 año es igual al de espinacas para niños de corta edad de la población europea considerado por EFSA (2010), y aceptando como válido para niños de 1-3 años el consumo de acelgas en niños de 7-12 años del modelo de dieta española (AESAN, 2006), las estimaciones de exposición crónica por consumo sólo de acelgas en niños de 1-3 años, considerando tres escenarios de concentración de nitratos, 1.562, 3.000 y 3.700 mg nitratos/kg (mediana, límite máximo permitido de nitratos en espinacas frescas, y contenido P95, respectivamente), son inferiores a la IDA de 3,7 mg/kg p.c. establecida, representando el 7,8%, 15,1% y 18,6% de dicha IDA, respectivamente.
- Las estimaciones de exposición aguda a nitratos por consumo de acelgas (mediana: 1.562 mg/kg nitratos) obtenidas en este informe, oscilan entre 1,6-7,2 mg/kg p.c./día, aproximadamente el doble de las alcanzadas por consumo de espinacas evaluadas por EFSA en 2010 (0,8-3,8 mg/kg p.c./día). Siguiendo los criterios de EFSA de considerar 15 mg/kg p.c./día como valor de referencia para evitar niveles elevados de Mhb en lactantes y niños de corta edad, las estimaciones indican que dicha dosis no se superaría en ninguno de los escenarios considerados, para los grupos de edad de 3, 6 y 9 meses, que son los más susceptibles de sufrir metahemoglobinemia. Solo los niños de 12 meses, en casos de consumo extremo y concentraciones más elevadas (3.700 mg/kg) alcanzarían una exposición de 17 mg/kg p.c./día, aunque dado el pequeño porcentaje de muestras de acelgas que superan dichos contenidos, la probabilidad de manifestaciones tóxicas agudas sería muy baja.
- Según los datos obtenidos, en España el contenido de nitratos en acelgas es superior al de las espinacas, por lo que este Comité aconseja que las recomendaciones de consumo para las espinacas se amplíen a las acelgas dada la importancia de su consumo.

- Este Comité considera apropiado que se establezcan límites máximos de nitratos en acelgas de igual forma que se han fijado para espinacas. Un contenido máximo de 3.000 mg nitratos/kg en acelgas no entrañaría riesgos de salud en niños lactantes y de corta edad (menores de 1 año y hasta 3 años).

Referencias

- Abo Bakr, T.M., El-Iraqi, S.M. y Huissen, M.H. (1986). Nitrate and nitrite contents of some fresh and processed Egyptian vegetables. *Food Chemistry*, 19, pp: 265-275.
- AEP (2002). Asociación Española de Pediatría. Protocolos de Nutrición. Alimentación del lactante sano. Disponible en: <http://www.aeped.es/documentos/protocolos-nutricion> [acceso: 14-4-11].
- AESAN (2006). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Modelo de dieta española para la determinación de la exposición del consumidor a sustancias químicas. Disponible en: http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/modelo_dieta_espanola.pdf [acceso: 21-6-11].
- Alonso Vega, L.A., Gutiérrez Conde, M.L.G., Canduela Martínez, V.C., Hernández Herrero, M.H., Tazón Varela, M.T. y Pérez Mier, L.A.P. (2007). Metahemoglobinemia en una lactante por consumo de puré vegetal. *Emergencias*, 19, pp: 283-285.
- ATSDR (2004). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Interaction profile for cyanide, fluoride, nitrate, and uranium. Atlanta: US Department of Health and Human Services. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/IP-09/ip09-a.pdf> [acceso: 21-6-11].
- Bartholomew, B. y Hill, M.J. (1984). The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food and Chemical Toxicology*, 22 (10), pp: 789-795.
- Bryk, T., Zalzstein, E. y Lifshitz, M. (2003). Methemoglobinemia induced by refrigerated vegetable puree in conjunction with supraventricular tachycardia. *Acta Paediatrica*, 92, pp: 1214-1215.
- Chung, J.C., Chou, S.S. y Hwang, D.F. (2004). Changes in nitrate and nitrite content of four vegetables during storage at refrigerated and ambient temperatures. *Food Additives and Contaminants*, 21, pp: 317-322.
- Da-Silva, S.S., Sajan, I.S. y Underwood, J.P. (2003). Congenital methemoglobinemia: a rare cause of cyanosis in the newborn-A case report. *Pediatrics*, 112 (2), pp: e158-e161.
- Dejonckheere, W., Steurbaut, W., Drieghe, S., Verstraeten, R. y Braeckman, H. (1994). Nitrate in food commodities of vegetable origin and the total diet in Belgium 1992-1993. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 12, pp: 359-370.
- EFSA (2008). European Food Safety Authority. Nitrate in vegetables. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 689, pp: 1-79. Question N° EFSA-Q-2006-071.
- EFSA (2010). Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. *The EFSA Journal*, 8 (12), pp: 1935.
- FAO/WHO (1996). Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Nitrate. Safety evaluation of certain food additives. Food Additives Series 35. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je14.htm> [acceso: 21-6-11].
- Gangolli, S.D., van den Brandt, P.A. y Feron, V.J. (1994). Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of Pharmacology*, 292, pp: 1-38.
- Gobierno Vasco (2003). Estudio sobre consumo de alimentos e ingesta de plaguicidas y nutrientes por niños/niñas de 8 a 12 meses de edad de la CAPV (proyecto Montecarlo). Informe técnico, pp: 1-24. Disponible en: https://www6.euskadi.net/r33-2709/es/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/proyectoMontecarlo_c.pdf [acceso: 9-6-11].
- Gobierno Vasco (2008). Departamento de Agricultura, Pesca y Alimentación. Estudio cuantitativo del consumo de alimentos en la CAPV. Guías Elika, 8. Disponible en: http://www.elika.net/pub_otras.asp?publicacion=39&seleccionado=10 [acceso: 9-6-11].

- Gómez Lumbreras, A.G., Solaz Moreno, L.S. y Villar Rubin, S.V. (2008). Intoxicación por puré de acelgas. *Anales de pediatría*, 69 (3), pp: 279-291.
- Greer, F.R. y Shannon, M. (2005). Infant methemoglobinemia: the role of dietary intake in food and water. *Pediatrics*, 116, pp: 784-786.
- Hack, W.W., Douwes, A.C. y Veerman, A.J. (1983). Spinach: A source of nitrite poisoning in young children. *Ned Tijdschr Geneesk*, 127, pp: 1428-1431.
- Herranz, M. y Clerigué, N. (2003). Intoxicación en niños. Metahemoglobinemia. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26 (1), pp: 209-223.
- IARC (2010). International Agency of Research in Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Ingested Nitrate and Nitrite and Cyanobacterial Peptide Toxins. Volume 94, pp: 1-325. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol94/index.php> [acceso: 21-6-11].
- IPCS (1999). International Programme on Chemical Safety. Nitrates and nitrites. Poisons Information Monograph (Group Monograph) G016.
- JECFA (1995). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Nitrate and nitrite. Evaluation of Certain Food Additives. Forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Who Technical Report Series 859. TRS 859-JECFA 44/29,32.
- JECFA (2002). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Nitrate and nitrite. Evaluation of Certain Food Additives. Fifty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Who Technical Report Series 913. TRS 913-JECFA 59/75.
- JECFA (2003). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Nitrate (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds). Safety evaluation of certain food additives. Who Food Additives Series: 50.
- Kanaan, S.S. y Economakis, C.D. (1992). Effect of climatic conditions and time of harvest on growth and tissue nitrate content of lettuce in nutrient film cultura. *Acta Horticulturae*, 323, pp: 75-80.
- Kersting, M., Alexy, U., Sichert-Hellert, W., Manz, F. y Schoch, G. (1998). Measured consumption of commercial infant food products in German infants: results from the DONALD study. Dortmund Nutritional and Anthropometrical Longitudinally Designed. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 27, pp: 547-552.
- Knobeloch, L., Salna, B., Hogan, A. y Postle, J. (2000). Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environmental Health Perspectives*, 108, pp: 675-678.
- Laporta Báez, Y.L., Goñi Zaballo, M.G., Pérez Ferrer, A.P., Palomero Rodríguez, M.A.P., Suso, B. y García Fernández, J.G. (2008). Metahemoglobinemia asociada a la ingesta de acelgas. *Anales de pediatría*, 69 (2), pp: 191-192.
- Meah, M.N., Harrison, N. y Davies, A. (1994). Nitrate and nitrite in foods and the diet. *Food Additives and Contaminants*, 11 (4), pp: 519-532.
- Menard, C., Heraud, F., Volatier, J.L. y Leblanc, J.C. (2008) Assessment of dietary exposure of nitrate and nitrite in France. *Food Additives and Contaminants*, 25 (8), pp: 971-988.
- NTP (2001). National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of sodium nitrite in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies). *National Toxicology Program Technical Report Series*, 495, pp: 7-273.
- Pérez-Caballero, C., Pérez, A. y Moreno, L. (2005). Probable metahemoglobinemia tras la administración de EMLA. *Anales de pediatría*, 63, pp: 179-180.
- Sánchez-Echaniz, J., Benito, J. y Mintegui, S. (2001). *Methemoglobinemia and consumption of vegetables in infants*. *Pediatrics*, 107, pp: 1024-1028.
- Sander, C. y Jacobi, H. (1967). Methemoglobin poisoning in a 2-year old boy after eating spinach. *Zeitschrift für Kinderheilkunde*, 98, pp: 222-226.
- Savino, F., Maccario, S., Guid, C., Castagno, E., Farinasso, D., Cres, F., Silvestro, L. y Mussa, G.C. (2006.) Methemoglobinemia caused by the ingestion of courgette soup given in order to resolve constipation in two formula-fed infants. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 50, pp: 368-371.

- SCF (1992). Scientific Committee for Food. Nitrates and nitrites. Reports of the Scientific Committee for Food. Twenty-sixth series.
- Schuster, B.E. y Lee, K. (1987). Nitrate and nitrite methods of analysis and levels in raw carrots, processed carrots and in selected vegetables and grain products. *Journal of Food Science*, 52 (6), pp: 1632-1636.
- Thomsom, B. (2004). Nitrates and nitrites dietary exposure and risk assessment. Institute of Environmental Science & Research Limited. Disponible en: http://www.foodsmart.govt.nz/elibrary/nitrates_nitrites_dietary.pdf [acceso: 29-3-11].
- UE (2006). Reglamento (CE) N° 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DO L 364 de 20 de diciembre de 2006, pp: 5-34.
- Van Velzen, A.G., Sips, A.J.A.M., Schothorst, R.C., Lambers, A.C. y Meulenbelt, J. (2008). The oral bioavailability of nitrate rich vegetables in humans. *Toxicological Letters*, 181 (3), pp: 177-181.
- Walker, R. (1990). Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Additives and Contaminants*, 7 (6), pp: 717-768.
- WHO (2003). World Health Organization. GEMS/FOOD Regional Diets. Food Safety Department. Geneva, Switzerland.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre contaminación vírica de los alimentos, con especial énfasis en moluscos bivalvos, y métodos de control

Miembros del Comité Científico

Rosaura Farré Rovira, Francisco Martín Bermudo, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Mariano Domingo Álvarez, Antonio Herrera Marteache, Félix Lorente Toledano, M^º Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, M^º Rosa Martínez Larrañaga, Antonio Martínez López, Cristina Nerín de la Puerta, Teresa Ortega Hernández-Agero, Perfecto Paseiro Losada, Catalina Picó Segura, Rosa María Pintó Solé, Antonio Pla Martínez, Daniel Ramón Vidal, Jordi Salas-Salvadó, M^º Carmen Vidal Carou.

Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2011-005

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de mayo de 2011

Grupo de Trabajo

Rosa M. Pintó Solé (Coordinadora)

M^º Rosario Martín de Santos

Albert Bosch Navarro (Consultor externo)

Resumen

Los principales virus asociados con enfermedades de transmisión alimentaria son los Norovirus humanos (NoV), causantes de gastroenteritis, y el virus de la hepatitis A (HAV) que origina hepatitis aguda. Estos virus no se multiplican *in vitro*, o lo hacen con muchas dificultades, por lo cual su detección en alimentos se basa en técnicas moleculares. Los principales alimentos involucrados en infecciones víricas transmitidas por alimentos son los moluscos bivalvos, las verduras que se consumen crudas y las frutas tipo baya. La estandarización de los métodos moleculares es requisito indispensable para que se puedan adoptar en marcos reguladores e implementar de forma rutinaria en el análisis de alimentos. Un grupo de trabajo del Comité Europeo de estandarización (CEN/TC 275/WG6/TAG4-*viruses in foods*) ha desarrollado y validado métodos de referencia para la detección de virus en matrices alimentarias. La determinación cuantitativa de virus en alimentos permitiría la predicción del riesgo sanitario asociado a su consumo, puesto que a mayor número de copias genómicas víricas mayor riesgo de infección.

Palabras clave

Norovirus humanos, virus de la hepatitis A, RNA, *Real-time*-RT-PCR, estandarización, copias genómicas.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to the viral contamination of foodstuffs, with special emphasis on bivalve molluscs and control methods.

Abstract

The viruses primarily associated with food-borne illness are human Norovirus (NoV), causing gastroenteritis, and Hepatitis A virus (HAV) causing acute hepatitis. These viruses do not grow, or grow

with many difficulties, *in vitro* and thus their detection in food matrices relies on molecular techniques. The major foodstuffs involved in food-borne viral infections are bivalve molluscs, salad vegetables and berries. Standardization of molecular methods is necessary before their adoption within regulatory frameworks and their routinely implementation in food analysis. A European standardization working group (CEN/TC 275/WG6/TAG4-viruses in foods) has developed standard methods for virus detection in foodstuffs. Quantitative determination of viruses in food would allow the assessment of the associated health risk after consumption of bivalves with a given number of virus genome copies since higher number of genome copies correlate with higher risk of infection.

Key words

Human Noroviruses, Hepatitis A virus, RNA, Real-time-RT-PCR, Standardization, Genome copies.

Introducción

Los virus entéricos son aquellos transmitidos por la vía fecal-oral y por ende aquellos que potencialmente pueden estar presentes en alimentos que hayan sufrido contaminación con materia fecal.

Entre los virus entéricos humanos destacan diversos agentes productores de gastroenteritis como los Norovirus, Sapovirus, Astrovirus, Rotavirus y Adenovirus del grupo F, así como los agentes de las hepatitis entéricas (A y E). Atendiendo al número de brotes alimentarios asociados a estos agentes, los más importantes desde la perspectiva de seguridad vírica de los alimentos son: Norovirus genogrupo I (NoV GI) y II (NoV GII) y el virus de la hepatitis A (HAV). No obstante, no hay que menospreciar la posibilidad de que se originen futuros brotes alimentarios de gastroenteritis por Sapovirus, debido a su creciente incidencia en la población, así como de hepatitis E que aun siendo una hepatitis de baja incidencia en nuestras latitudes es muy común en China y sudeste asiático y, en el contexto actual de comercio global de alimentos, representa un riesgo potencial. Cabe destacar que algunos animales, como el cerdo y el jabalí, pueden también ser infectados por el virus de la hepatitis E y actuar como reservorio del virus, puesto que se han documentado algunos casos de infección en humanos por consumo de hígado poco cocinado proveniente de animales infectados.

Entre los alimentos que presentan un mayor riesgo de estar contaminados por virus entéricos destacan los moluscos bivalvos por su alta capacidad de filtración y de concentración de los virus potencialmente presentes en el agua de cultivo, así como las verduras que se consumen en ensalada y las frutas tipo baya irrigadas con aguas con aportes fecales. Este tipo de alimentos suelen consumirse crudos o poco cocinados incrementando al máximo el riesgo de infección. Asimismo, es posible la contaminación de los alimentos por una manipulación higiénica deficiente por parte de los manipuladores, tanto sintomáticos como asintomáticos, excretores de virus.

Un importante factor que contribuye a la transmisión de los virus entéricos a través de alimentos es su elevada estabilidad extracorpórea o ambiental que en algunos casos, como por ejemplo en el HAV, es extrema.

Debido a que los alimentos son una de las fuentes de transmisión de los virus entéricos, a que, en ocasiones, los brotes afectan a comunidades cerradas de poblaciones de riesgo (hospitales, residencias) y a que España es un importante país productor y consumidor de moluscos bivalvos, que son uno de los principales alimentos potencialmente involucrados en la transmisión de estos virus, la Dirección Ejecutiva de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha solicitado al Comité Científico la elaboración de un informe que valore el estado del conocimiento respecto a la contaminación vírica de los alimentos, con especial énfasis en moluscos bivalvos, y sus métodos de control.

Este informe permitirá valorar el grado de conocimiento sobre este tema en España y hacer un planteamiento de futuro respecto a las necesidades de información que se suscitan ante la posibilidad de que, por parte de la Comisión Europea, se establezcan límites para determinados virus en alimentos (moluscos bivalvos).

Biología de los Norovirus (NoV)

Los Norovirus (NoV) son miembros de la familia *Caliciviridae* (Fauquet et al., 2005) y como tales son virus no envueltos con cápside icosaédrica de unos 27-40 nm de diámetro en cuyo interior albergan un

genoma RNA de cadena simple de polaridad positiva de unas 7 Kb. Dicho genoma contiene tres pautas abiertas de lectura que codifican respectivamente para las proteínas no estructurales, que incluyen los enzimas requeridos en la replicación y una proteasa, la proteína mayoritaria de la cápside o VP1 y la proteína minoritaria de la cápside o VP2. Una característica muy importante del genoma de los Norovirus es su elevada variabilidad (Domingo y Vennema, 2008).

Por otra parte, hay que destacar que a pesar de inmensos esfuerzos no se ha conseguido replicar estos virus en cultivo celular (Duizer et al., 2004). Aunque existen referencias que indican lo contrario, la falta de reproducibilidad de los resultados descritos pone en duda la veracidad de la adaptación de los Norovirus a multiplicar en cultivo celular (Straub et al., 2007). Se cree que la incapacidad de replicar *in vitro* viene determinada por la falta del receptor(es) adecuados en las líneas celulares testadas puesto que la transfección del RNA vírico da lugar a ciclos infecciosos monocelulares (Guix et al., 2007). En definitiva, todo ello lleva a la utilización de técnicas moleculares para su detección (Kageyama et al., 2003) (Loisy et al., 2005) (Lowther et al., 2008). Ello unido a la alta variabilidad anteriormente citada implica la necesidad de escoger, mediante criterios muy sólidos las regiones mejor conservadas del genoma para el desarrollo de las técnicas moleculares de detección (Pintó y Bosch, 2008).

Los NoV se clasifican en cinco grandes genogrupos. Los NoV humanos pertenecen a los genogrupos I (GI), II (GII) y IV (GIV). Dentro del genogrupo II se encuentran también virus que infectan cerdos y en el genogrupo III virus que infectan bovinos y aunque no se ha demostrado de forma fidedigna se ha sugerido que podría tratarse de agentes zoonóticos. Cada genogrupo contiene múltiples genotipos que emergen y varían temporalmente (Koopmans, 2005) (Siebenga et al., 2007b) (Domingo y Vennema, 2008) (Kroneman et al., 2008). Los genogrupos se denominan por números romanos y los genotipos por números árabes (Atmar, 2010).

La transmisión de los NoV humanos se da, principalmente, vía ingestión de agua o alimentos contaminados así como por contacto persona-persona o por contacto con fomites contaminados. Ciertos genotipos se asocian más a un tipo de transmisión concreto. Así se ha descrito que el genotipo GII.4 se transmite mayoritariamente por contacto persona-persona, mientras que los brotes originados por consumo de bivalvos contaminados se asocian generalmente al genogrupo GI (Le Guyader et al., 2006b) (Siebenga et al., 2007a). No hay que olvidar que se ha demostrado que los Norovirus humanos del genotipo GI.1 se internalizan de forma específica en las células del hepatopáncreas de ostras (Le Guyader et al., 2006a). Además se han descrito diferencias entre los distintos genotipos en cuanto a la interacción con distintos ligandos. Así el genotipo GI.1 usa como ligando un carbohidrato que contiene un antígeno *A-like*, y que está presente sólo en células del hepatopáncreas, mientras que el genotipo GII.4 utiliza además de este carbohidrato otro que contiene ácido siálico y que se halla presente en la gran mayoría de tejidos (Le Guyader et al., 2006a) (Maalouf et al., 2010). Se cree que la unión a ligandos con ácido siálico sería más débil, de forma que los virus del genotipo GII.4 se internalizarían con menor eficiencia que la unión a ligandos con antígeno *A-like* lo cuál contribuiría a una mayor persistencia de los virus del genotipo I.1 y a una menor eficacia de los procesos de depuración.

El período de incubación de la enfermedad oscila de 10 a 51 horas y la dosis infecciosa es baja (Glass et al., 2009). Para el caso concreto del virus Norwalk, Teunis et al. (2008) estimaron una dosis infecciosa al 50% de entre 18 y 1.000 partículas víricas. En cierto tipo de alimentos como el marisco se detectan

habitualmente concentraciones muy superiores a las citadas, quedando patente el riesgo asociado (Le Guyader et al., 2003) (Le Guyader et al., 2010). Por otra parte, estos niveles de virus son excretados por pacientes antes de mostrar ninguna sintomatología e incluso después de que ésta haya cesado, lo cual pone de manifiesto el potencial papel de los manipuladores de alimentos en la transmisión de la gastroenteritis por NoV. Se estima que las gastroenteritis por NoV de origen alimentario representan entre un 12% y un 47% del total de gastroenteritis por NoV y el resto se originaría por contacto persona-persona o contacto con fomites contaminados (FAO/WHO, 2008).

Biología del virus de la hepatitis A (HAV)

El virus de la hepatitis A (HAV) pertenece a la familia *Picornaviridae* (Fauquet et al., 2005) y como tal es un virus desnudo con cápside icosaédrica de unos 27 nm de diámetro que contiene un RNA de polaridad positiva de unas 7 Kb. A diferencia de los NoV, el genoma de los picornavirus contiene una única pauta de lectura abierta. A nivel genético, el HAV destaca por tener una tasa de mutación alta a nivel de mutaciones sinónimas, dentro del intervalo de otros picornavirus, pero una tasa especialmente baja en cuanto a mutaciones no sinónimas (Sanchez et al., 2003), sobretudo a nivel de la cápside. Esta característica denota fuertes constricciones estructurales que explican la baja variabilidad aminoacídica de la región de la cápside y la existencia de un único serotipo. Sin embargo, bajo presión inmune se pueden seleccionar mutantes de escape a anticuerpos monoclonales *in vitro* (Aragonès et al., 2008) e incluso a las vacunas existentes *in vivo* (Perez-Sautu et al., 2011). La razón última de dichas constricciones estructurales se encuentra a nivel genómico en un uso muy sesgado de codones que es antagónico al de la célula hospedadora y con una localización estratégica de acumulaciones de codones raros en ciertas regiones del genoma codificante de la cápside, con el fin de ralentizar la velocidad de traducción y permitir el plegamiento correcto de la proteína (Aragonès et al., 2010). Ello permite al virus tener una cápside altamente cohesiva, siendo muy destacable la estabilidad del HAV frente a diversos agentes físicos y químicos, como altas temperaturas y bajo pH (Hollinger y Emerson, 2007), a diversas condiciones ambientales extremas, como desecación (Abad et al., 1994), y a desinfección (Abad et al., 1994). La necesidad de mantener estas agrupaciones de codones raros, que jugarían un papel importante en la biología estructural de la cápside del virus, explicaría la baja variabilidad aminoacídica puesto que es infrecuente una mutación que dé lugar a un cambio de aminoácido compatible con la estructura y que además conserve el grado de rareza del codón. Este uso especial de codones se debe además contextualizar con otras características muy particulares de la biología molecular del HAV como son una formación, altamente ineficiente, del complejo de iniciación de la traducción (Brown et al., 1994) (Whetter et al., 1994) y la incapacidad de inducir la inhibición de la síntesis proteica celular (Ali et al., 2001). En conjunto todo ello contribuye a unas tasas de replicación del virus muy bajas y así sólo unas pocas cepas del virus se han podido adaptar a la multiplicación en cultivo celular. Las cepas silvestres del virus se deben detectar por técnicas moleculares basadas en regiones altamente conservadas del genoma.

A pesar de existir un único serotipo del virus, se reconocen seis genotipos (I al VI) de los cuales el I, II y III corresponden a cepas humanas y el IV, V y VI a cepas de simio (Costa-Mattioli et al., 2002). No existen datos que indiquen que unos genotipos se transmitan más de un modo u otro, como se

ha señalado para los NoV, y ni siquiera parece que haya diferencias en cuanto a patogenicidad entre los distintos genotipos (Rezende et al., 2003). Los genotipos más bien denotan distintos orígenes geográficos (Robertson et al., 1992).

La hepatitis A es una hepatitis aguda que nunca cronifica. El período de incubación es de alrededor de tres semanas durante las cuales el virus se excreta asintóticamente en grandes cantidades en las heces de los pacientes. Ello es así porque es durante este período que el virus replica activamente en hígado, pero la sintomatología, que incluye elevación de las transaminasas e inflamación hepática, viene dada más por la respuesta inmune celular adaptativa al cabo de las tres semanas, que por la propia replicación vírica (Hollinger y Emerson, 2007). Otro problema añadido, desde la perspectiva de la contaminación de alimentos, es que en niños menores de 5 años la hepatitis A es mayormente asintomática pero el virus se excreta en grandes cantidades. La dosis infecciosa es muy baja y se ha estimado en 10-100 partículas (FDA/CFSAN, 1992). Como en el caso de los NoV estos bajísimos niveles se superan ampliamente en las heces de los pacientes (10^8 copias genómicas por gramo) y de ahí la importancia de los excretores asintomáticos.

A diferencia de los NoV, que son virus emergentes a escala global, el HAV es sólo endémico en países con condiciones sociosanitarias bajas y de ahí la trascendencia de las importaciones de alimentos contaminados (Costafreda et al., 2006) (Pinto et al., 2009) (Polo et al., 2010). Además, en los países no endémicos, como España, la población no entra en contacto con el HAV en la infancia con lo cual llega a la edad adulta inmunológicamente *naïve* y es precisamente en la edad adulta cuando se manifiesta la infección clínicamente más importante llegando a una mortalidad del 1% en la población de más de 60 años (Hollinger y Emerson, 2007).

Se estima que las hepatitis A de origen alimentario representan sólo alrededor del 5% del total y el resto se originarían por contacto persona-persona o contacto con fomites contaminados (FAO/WHO, 2008).

Detección y cuantificación molecular de NoV humanos y HAV en matrices alimentarias

Como se ha señalado anteriormente, ni las cepas silvestres del HAV ni los NoV humanos replican en cultivo celular lo cual hace necesaria la aplicación de técnicas moleculares para su detección y cuantificación, puesto que alternativas como la detección inmunológica presentan el inconveniente de falta de sensibilidad para la detección de los bajos niveles de contaminación presentes en los alimentos. En los últimos años se han publicado numerosas metodologías basadas en la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), concretamente en la combinación de la retrotranscripción de RNA a cDNA y la amplificación del cDNA por PCR (técnica de RT-PCR), para la detección del HAV y NoV en matrices alimentarias. Sin embargo, aunque todas ellas, más o menos correctas dependiendo de una buena selección de *primers* de regiones altamente conservadas de los genomas, adolecen de falta de armonización y estandarización. Es por ello que un Comité de la Dirección General Sanco de la Unión Europea (UE) (CEN/TC 275/WG6/TAG4-*viruses in foods*) está desarrollando y validando desde 2004 una doble metodología estandarizada (cuantitativa y cualitativa) para la detección del HAV y NoV humanos en matrices alimentarias (verduras de ensalada, superficies alimentarias, frutas tipo

baya, moluscos bivalvos y agua embotellada) con el fin de establecer métodos de referencia. La parte primera del estándar (método cuantitativo) y la segunda parte (método cualitativo) se presentaron en 2009 y 2010, respectivamente, a los países miembros del Comité Europeo de Normalización (CEN) para su valoración técnica y formal. La publicación definitiva de los métodos se espera para 2012.

La estandarización de las metodologías se basa en tres puntos:

- En primer lugar, es clave escoger las regiones más conservadas del genoma de los virus a detectar, para que las técnicas sean de amplio espectro. La estructura secundaria del genoma de los virus RNA puede tener en sí misma una función determinante en el ciclo replicativo del virus. Por ello, es evidente que las regiones genómicas involucradas en la formación de dichas estructuras deberán ser altamente conservadas entre cepas y, por lo tanto, que la secuencia de las mismas tenderá a ser menos variable. Diseñar *primers* dirigidos contra dichas regiones es un valor seguro para hacer frente a la alta tendencia a la variación que presentan los virus RNA (Pintó y Bosch, 2008). En el caso del HAV, la región mejor/más altamente conservada se halla en el extremo 5' no codificante del genoma puesto que contiene una estructura secundaria implicada en la formación del complejo de iniciación de la traducción, concretamente la estructura denominada IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) (Costafreda et al., 2006). En el caso de los NoV no existe una estructura parecida al IRES del HAV y una alternativa es la región comprendida entre el final del ORF1 (pauta de lectura abierta codificante de la polimerasa) y el principio del ORF2 (pauta de lectura abierta que codifica para las proteínas de la cápside) o unión ORF1/ORF2 dónde se ha detectado un alto grado de conservación filogenética y dónde presumiblemente debe de existir una estructura del RNA que permita la síntesis del RNA subgenómico molde para la producción de altas cantidades de proteínas de la cápside (Kageyama et al., 2003).
- En segundo lugar, las reacciones moleculares para la retrotranscripción del RNA (Transcriptasa inversa, RT) hasta cDNA y su posterior amplificación (Polimerasas termoestables) son muy sensibles, particularmente la RT, a diversidad de inhibidores. Es por ello necesario la inclusión de controles exhaustivos que convenientemente adicionados a los tubos de reacción permitan controlar la eficiencia de las actividades enzimáticas.
- En tercer lugar, y de forma muy importante, es necesario controlar el punto más crítico de la detección de virus en alimentos: el proceso de extracción de los virus y sus genomas. Cualquier método molecular, por sensible que sea, será un rotundo fracaso si no se consigue extraer de forma eficiente los ácidos nucleicos a detectar. Por desgracia, no existen métodos milagrosos para la extracción de los ácidos nucleicos víricos a partir de matrices alimentarias y los mejores de ellos ofrecen eficiencias que no suelen superar el 10%. Por ello es de vital importancia controlar la eficiencia de dicho proceso y la mejor alternativa es el uso de un virus modelo añadido a concentraciones conocidas a la muestra, previamente al proceso de extracción. Dicho virus control debe cumplir una serie de requisitos que son: tener una estructura parecida y propiedades fisicoquímicas similares a los virus diana a detectar, que nunca pueda estar presente en las muestras y por supuesto que no tenga potencial patogénico, es decir un virus atenuado (Pintó y Bosch, 2008).

Todas estas premisas se contemplan y cumplen rigurosamente en el protocolo CEN/TC 275/WG6/ TAG4-*viruses in foods*. Además, la inclusión de los controles descritos permite no sólo detectar cualitativamente la presencia de virus en alimentos, sino que disponiendo de sistemas de determinación de las eficiencias de los puntos críticos de la técnica permite cuantificar con buena precisión el número de copias genómicas presentes en la muestra.

Disponer de una metodología estandarizada que permita comparar datos obtenidos por distintos laboratorios y analizar la contaminación de productos de diversas procedencias geográficas representa un valor añadido importantísimo desde la perspectiva de la seguridad vírica de los alimentos. Sin embargo, las técnicas moleculares adolecen de no proporcionar información sobre el potencial infeccioso de los virus presentes en una muestra alimentaria, puesto que lo que se determina es la presencia del genoma de los virus (técnicas cualitativas) o el número de copias genómicas (técnicas cuantitativas) y ello no es sinónimo de infectividad, puesto que podría ser que la cápside del virus estuviera alterada e incapaz de unirse al receptor e iniciar el ciclo biológico, o incluso que el genoma estuviera alterado en otras regiones distintas a la de detección. Es por ello de vital importancia llevar a cabo estudios rigurosos del nivel de contaminación presente en distintos tipos de alimentos y con procedencias distintas y compararlo con los niveles de ataque asociados entre sus consumidores, para intentar determinar el nivel máximo permisible de copias genómicas en dichos alimentos. Es decir, al menos para las técnicas cuantitativas, se trata de establecer unos límites por debajo de los cuales el riesgo de infección tras el consumo de esos alimentos sea muy bajo, teniendo en cuenta que el riesgo cero no existe.

Contaminación por NoV humanos y HAV en moluscos bivalvos: revisión bibliográfica

El tipo de alimento que ha sido analizado de forma más exhaustiva y rutinaria para la detección de virus entéricos es el molusco bivalvo. Por ello, este informe se centra en los datos existentes en este tipo de matriz alimentaria.

Los moluscos bivalvos son animales filtradores que concentran el material particulado presente en los grandes volúmenes de agua que diariamente filtran con el fin de obtener su alimentación. Entre dicho material particulado se pueden encontrar protozoos, bacterias y virus que infectan humanos si las aguas de cultivo han recibido vertidos fecales. Aunque estos agentes patógenos se encuentran diluidos en el agua de cultivo, después del proceso de filtrado quedan concentrados en los tejidos de los bivalvos, especialmente en el hepatopáncreas. En la actualidad no existen tratamientos de depuración de marisco bivalvo cien por cien efectivos en la eliminación de virus, y los que consiguen mayores eliminaciones son incompatibles con las exigencias organolépticas de este tipo de alimento. Por ello, la prevención de las infecciones asociadas al consumo de bivalvos pasa por el control de las aguas de cultivo. Sin embargo, los criterios microbiológicos clásicos basados en recuentos de *Escherichia coli* en el agua de cultivo o en tejido de bivalvo no garantizan la ausencia de virus en los bivalvos. Por ello, es recomendable la detección y/o cuantificación de virus ya sea en las aguas de cultivo o en el propio marisco bivalvo. El laboratorio de referencia para el control de la calidad vírica del marisco bivalvo de Europa, en colaboración con los laboratorios de referencia de los Estados miembros de la UE, ha optado por el control de virus en producto final.

En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de muestras positivas para NoV humanos y/o HAV en distintos estudios que analizan la presencia de dichos virus en moluscos bivalvos recolectados y distribuidos en distintos países europeos durante el período 2001-2008. En nueve estudios se analizaron sólo NoV, en dos sólo HAV y en cinco ambos virus. En estos últimos estudios, que comprenden análisis de muestras procedentes de Francia, España e Italia, destaca la mayor frecuencia de detección de NoV humanos. Además, se pone de manifiesto la alta prevalencia de HAV en muestras originarias de Italia, concretamente en los mares Jónico y Adriático que bañan las costas de la región de la Puglia que es endémica para hepatitis A. En el resto de estudios de marisco procedente de otros países europeos destaca la alta frecuencia de detección de NoV humanos que es, por otro lado, independiente de la categoría de la zona de recolección, es decir no existe correlación entre la positividad para NoV humanos y el nivel de contaminación bacteriano de la zona de cultivo. Dicha observación está en concordancia con muchos trabajos publicados con anterioridad (Le Guyader et al., 2000) (Romalde et al., 2002) (Vilarino et al., 2009). Y de ahí un argumento más para el control de la presencia de virus en marisco puesto que no hay garantía de ausencia de virus con las actuales normas de clasificación de las zonas de cultivo. Sin embargo, ello no significa que no deba controlarse el agua de las zonas de cultivo sino todo lo contrario hay que controlarlas según los criterios microbiológicos habituales y además se debe establecer un control de la presencia de virus.

Tabla 1. Porcentaje de muestras de marisco positivas para NoV humanos y/o HAV en distintos estudios de análisis de marisco recolectado en las costas europeas							
País de origen	Punto muestreo	Fecha de recolección	Número muestras	Técnica detección	NoV	HAV	Referencia
Francia	Tienda al detalle	2004-2008	58	<i>Real time</i>	12%	NT ¹	(Boxman, 2010)
	Holanda			RT-PCR			
	Tienda al detalle Suiza	2001-2002	61	RT-PCR	13%	0%	(Beuret et al., 2003)
España							
Galicia	Área B	2005	24	<i>Real time</i> RT-PCR	58%	0%	(Vilarino et al., 2009)
	Área C	2005	17	<i>Real time</i> RT-PCR	53%	0%	(Vilarino et al., 2009)
Italia							
Delta del río Po	Área B	2005-2006	96	RT-PCR y <i>Real time</i>	10%	0%	(Suffredini et al., 2008)
Mar Adriático	Área B	2003-2004	235	RT-PCR	14%	6%	(Crocì et al., 2007)
Puglia	Tienda al detalle Italia	2005-2008	116	RT-PCR	12%	NT	(Terio et al., 2010)
Mar Jónico	Área B	2002	29	RT-PCR	NT	90%	(Di Pinto et al., 2003)
Mar Jónico	Área C	2002	20	RT-PCR	NT	30%	(Di Pinto et al., 2003)
Gran Bretaña/Irlanda							
Gran Bretaña	Área B	2004-2006	237	<i>Real time</i> RT-PCR	57%	NT	(Lowther et al., 2008)
Irlanda	Área A	2005-2007	119	<i>Real time</i> RT-PCR	31%	NT	(Flannery et al., 2009)
Irlanda	Área B	2005-2007	42	<i>Real time</i> RT-PCR	54%	NT	(Flannery et al., 2009)
Irlanda	Área C	2005-2007	6	<i>Real time</i> RT-PCR	33%	NT	(Flannery et al., 2009)
Holanda							
Holanda	Tienda al detalle	2004-2008	126	<i>Real time</i>	9%	NT	(Boxman, 2010)
	Holanda			RT-PCR			
Holanda	Área A	2004-2008	104	<i>Real time</i> RT-PCR	1%	NT	(Boxman, 2010)
Holanda	Área A	2003-2004	21	RT-PCR	5%	NT	(Boxman et al., 2006)
Alemania/Países Nórdicos							
Alemania/ Dinamarca	Área A	2004-2008	36	<i>Real time</i> RT-PCR	11%	NT	Boxman, comunicación personal
Noruega	Área A	2000-2003	681	<i>Real time</i> RT-PCR	7%	NT	(Myrnel et al., 2004)

¹NT: No tratado. **Fuente:** (Boxman, 2010).

Niveles de contaminación por NoV humanos y HAV en moluscos bivalvos distribuidos en España

Distintos laboratorios españoles están ya implementando las metodologías desarrolladas en el CEN/TC 275/WG6/TAG4-*viruses in foods* para el control y cuantificación de virus en marisco.

En la Tabla 2 se muestran los niveles de contaminación para NoV humanos GI y GII y HAV de distintos tipos de marisco de diversa procedencia. Los resultados mostrados son las medias de las copias genómicas crudas por gramo de hepatopáncreas, sin aplicar los factores de corrección de eficiencia de extracción y amplificación, puesto que la metodología CEN/TC 275/WG6/TAG4-*viruses in foods* establece que las muestras con eficiencias de extracción y/o amplificación <1% no son cuantificables y deben considerarse simplemente positivas. Mientras la eficiencia de la técnica de RT-PCR suele ser muy buena, un porcentaje considerable de los análisis adolece de una extracción ineficiente. Es por ello que la Tabla 2 sólo incluye valores crudos puesto que la eficiencia de extracción de muchas muestras es inferior al 1% de corte. Que la eficiencia de extracción es el paso más crítico en la detección y particularmente en la cuantificación de virus en muestras de moluscos bivalvos es un hecho ampliamente descrito (Costafreda et al., 2006) (Pintó y Bosch, 2008) (Le Guyader et al., 2009). Pero además, la eficiencia de la extracción depende en gran medida de la experiencia y familiarización de los laboratorios en las metodologías empleadas. La Tabla 3 refleja la alta variabilidad entre laboratorios, hecho que de nuevo justifica la necesidad de incluir controles de extracción en los ensayos.

Tabla 2. Análisis de los niveles de contaminación vírica de marisco distribuido en España. Los virus testados son NoV humanos GI y GII y HAV. La concentración vírica se expresa como media \pm SD de las copias genómicas brutas por gramo de hepatopáncreas, es decir sin aplicar correcciones debidas a las eficiencias de los procesos de extracción y/o amplificación. En aquellos casos dónde se dispone de una única muestra se indica el resultado puntual. Las muestras negativas no se incluyen en el cálculo de las medias

Alimento	País origen	NoV GI	NoV GII	HAV
<i>Meretrix lyrata</i>	Corea del Sur/Vietnam	$2,5 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^3$	<1	$1,9 \times 10^3$
<i>Tapes decussatus</i>	España	$4,5 \times 10^3 \pm 4,7 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2 \pm 9,9 \times 10^1$	$4,5 \times 10^2 \pm 2,7 \times 10^2$
<i>Transennella pannosa</i>	Perú	$6,5 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^3 \pm 8,7 \times 10^2$	<1
<i>Ensis</i> spp.	Marruecos	$1,1 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$	<1	<1
<i>Mytilus edulis</i>	España	<1	$3,4 \times 10^2 \pm 4,2 \times 10^2$	<1
<i>Callista chione</i>	Marruecos	$5,3 \times 10^5 \pm 5,8 \times 10^4$	<1	<1
<i>Ostrea edulis</i>	Desconocido	$4,4 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2 \pm 7,6 \times 10^1$	<1
<i>Donax</i> spp.	Marruecos/Perú	$8,8 \times 10^3$	$3,4 \times 10^2 \pm 3,9 \times 10^2$	$5,6 \times 10^3 \pm 6,4 \times 10^3$

Datos proporcionados por: Dra. Susana Guix del Laboratorio de Virus Entéricos, del Departamento de Microbiología y el Instituto de Nutrición y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Barcelona; Dr. Jesús López-Romalde del Departamento de Microbiología y Parasitología y Centro de Investigaciones Biológicas (CIBUS)-Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela; Dra. Joana Pardos de la Agència de Protecció de la Salut del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya, Girona; Dr. David Tomás de AINIA Centro Tecnológico, Valencia.

Tabla 3. Porcentaje de muestras de marisco con eficiencias de extracción de virus y ácidos nucleicos consideradas malas (<1%), y que requieren repetir el análisis, aceptables (1%-10%) y buenas (>10%)

Eficiencia Extracción	Lab. 1	Lab. 2	Lab. 3	Lab. 4	Media±SD
<1%	0	3	100	23	31±47
1%-10%	95	45	0	59	50±39
>10%	5	52	0	18	19±23

En la Tabla 4 se muestran los valores corregidos de todas aquellas muestras para las que se obtuvieron eficiencias de extracción por encima del nivel de corte del 1% propuesto por la metodología CEN/TC 275/WG6/TAG4-*viruses in foods*. Como puede observarse los niveles de copias genómicas por gramo de hepatopáncreas aumentan de forma significativa debido a los factores de corrección.

Tabla 4. Análisis de los niveles de contaminación vírica de marisco distribuido en España. Los virus testados son NoV humanos GI y GII y HAV. La concentración vírica se expresa como media ± SD de las copias genómicas por gramo de hepatopáncreas corregidas teniendo en cuenta las eficiencias de extracción y/o amplificación. Las muestras negativas no se incluyen en el cálculo de las medias. En aquellos casos dónde se dispone de una única muestra se indica el resultado puntual. Las muestras negativas no se incluyen en el cálculo de las medias

Alimento	NoV GI	NoV GII	HAV
<i>Meretrix lyrata</i>	$2,6 \times 10^7 \pm 4,4 \times 10^7$	<1	ND*
<i>Tapes decussatus</i>	ND	$7,7 \times 10^3 \pm 4,6 \times 10^3$	ND
<i>Ensis</i> spp.	$6,7 \times 10^5 \pm 8,9 \times 10^3$	ND	ND
<i>Mytilus edulis</i>	ND	$8,4 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^2$	ND
<i>Donax</i> spp.	$2,2 \times 10^4$	ND	$2,5 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^5$

*ND. No determinado por falta de datos sobre las eficiencias de extracción y/o amplificación o por ser eficiencias inferiores al 1%.

En cualquier caso es destacable la mayor frecuencia de detección de NoV que de HAV y los mayores niveles de NoV GI que GII. Estos resultados están en concordancia con la bibliografía (Le Guyader et al., 2006b).

Seguridad vírica de los alimentos

Como se indicaba anteriormente, no existen datos que permitan confirmar que todo el marisco contaminado con virus se asocie a patología en el consumidor. Que se dé una infección vírica tras el consumo de un alimento contaminado va a depender de una serie de factores, entre ellos: 1) del número de virus presentes en el alimento, 2) del procesado del alimento que podrá contribuir a inactivar el virus, 3) de la estabilidad del virus frente a ese procesado, 4) de la dosis infecciosa del virus y evidentemente 5) de la susceptibilidad del individuo consumidor. Este último punto es individual e incontrolable, la dosis infecciosa de NoV humanos y particularmente del HAV es muy baja, como ya se ha indicado anteriormente, en cuanto al procesado la mayoría de alimentos se van a consumir crudos o poco hechos y además hay que tener en cuenta que estamos frente a agentes altamente estables y, por lo tanto, el punto más controlable es el nivel de contaminación.

Por todo ello y para hacer compatibles la seguridad vírica de los alimentos y la economía del sector productivo, de aquellos alimentos contaminados en origen, no es suficiente con detectar virus sino que es recomendable cuantificar los títulos de copias genómicas de forma estandarizada y establecer niveles de permisibilidad por encima de los cuáles el alimento testado sea considerado no apto para el consumo, al menos mientras no existan sistemas de inactivación vírica efectivos que no afecten las propiedades organolépticas de los alimentos en cuestión.

La gran incógnita, sin embargo, sigue siendo la determinación del potencial replicativo de las copias genómicas. Reformulando la pregunta: ¿cuántas copias genómicas han de ingerirse para originar una infección en un individuo susceptible? Esta es la pregunta clave para la cuál todavía no existe una respuesta exacta. Para el caso del HAV se ha descrito que la relación "nativa", es decir sin que medie ningún tipo de mecanismo de inactivación, entre partículas físicas o copias genómicas y virus infecciosos, es de aproximadamente 60:1 (Jansen et al., 1988) (Deng et al., 1994). Por otro lado, un estudio llevado a cabo durante la investigación de un brote de hepatitis A causado por el consumo de tellinas contaminadas (Costafreda et al., 2006) (Pinto et al., 2009) describe la existencia de linealidad entre la dosis infecciosa, calculada en base a la relación anteriormente citada de copias genómicas: virus infecciosos de 60:1 y determinando el título de copias genómicas mediante una metodología estandarizada que incluye factores correctivos para la eficiencia de extracción y amplificación, y el nivel de infección en la población consumidora. Así se estima que $4,3 \times 10^3$ copias genómicas (72 partículas infecciosas) producirían infección en un 11% de los consumidores, $2,5 \times 10^4$ copias genómicas (420 partículas infecciosas) producirían infección en un 36% de los consumidores y $3,5 \times 10^4$ copias genómicas (582 partículas infecciosas) producirían infección en un 41% de los consumidores. En el caso de NoV humanos la relación de copias genómicas: virus infecciosos no se ha podido determinar debido a la falta de cepas que se multipliquen en cultivo celular. No obstante, sí existen estudios que demuestran correlación positiva entre la carga vírica en alimentos y su capacidad para producir infección (Lowther et al., 2010), aunque por falta de aplicación de factores correctivos y la utilización de unidades de PCR en lugar de copias genómicas es difícil comparar los resultados publicados con otros que se puedan generar.

En cualquier caso la implementación de metodologías estandarizadas para la determinación de las copias genómicas de NoV humanos y HAV en alimentos potencialmente contaminados en origen, aunque no defina de forma exacta el potencial de riesgo asociado, sí constituye una aproximación y por ende representa un paso adelante en el control de la seguridad vírica de los alimentos y un valor añadido para aquellos alimentos que se consideren aptos para el consumo.

Sin embargo, es importante enfatizar que sólo un porcentaje pequeño de las gastroenteritis por NoV y hepatitis A están directamente asociadas al consumo de alimentos. La gran mayoría de casos son por contacto persona-persona o por contacto con fomites contaminados y estos casos podrían prevenirse con medidas higiénicas correctas como el lavado de manos frecuente y sobretodo después de usar el baño.

Conclusiones del Comité Científico

1. La presencia de virus entéricos, particularmente Norovirus humanos y el virus de la hepatitis A, en alimentos contaminados con materia fecal es causa de gastroenteritis y hepatitis entéricas de origen alimentario. Así pues se hace necesario controlar su presencia con métodos suficientemente

sensibles para detectar los bajos niveles de virus presentes en dichos alimentos que sin embargo representan un riesgo sanitario por la baja dosis infecciosa de los virus entéricos. Con todo es necesario destacar que la mayoría de infecciones por Norovirus humanos y el virus de la hepatitis A se originan por contacto persona-persona y por contacto con fomites contaminados y que el porcentaje de casos asociados a consumo de alimentos contaminados es bajo.

2. Los alimentos más frecuentemente asociados a gastroenteritis y hepatitis son los contaminados en origen como moluscos bivalvos, verduras de ensalada y frutos tipo baya que se consumen crudos o poco cocinados y en menor medida alimentos contaminados por manipulación incorrecta después de su cocinado.
3. Los Norovirus humanos y las cepas silvestres del virus de la hepatitis A no multiplican *in vitro* en cultivos celulares. Por ello, los métodos más adecuados para su detección gracias a su sensibilidad son los basados en la amplificación por PCR y concretamente en la técnica de RT-PCR, ya que se trata de virus RNA.
4. Las técnicas actuales de RT-PCR a tiempo real permiten detectar y cuantificar la carga viral de una muestra. Sin embargo, requieren de una exhaustiva estandarización y de la inclusión de controles de los pasos críticos de la técnica que son la extracción de virus y ácidos nucleicos y las reacciones moleculares de RT-PCR. La metodología desarrollada por el Comité Europeo de Normalización CEN/TC 275/WG6/TAG4-viruses *in foods*, cumple con estos requisitos y va ser próximamente publicada.
5. Aunque las técnicas moleculares de cuantificación (copias de genomas víricos) adolecen de falta de información sobre el potencial infeccioso de las muestras analizadas, existen datos que confirman la correlación entre título de copias genómicas y potencial infeccioso de la muestra. A partir de aquí es necesario definir los límites máximos de copias genómicas permisibles presentes en muestras alimentarias a fin de disminuir al máximo el riesgo para la salud teniendo en cuenta que el riesgo cero no existe.

Referencias

- Abad, F.X., Pinto, R.M. y Bosch, A. (1994). Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, pp: 3704-3710.
- Abad, F. X., Pinto, R. M., Diez, J. M. y Bosch, A. (1994). Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, pp.: 2377-2383.
- Ali, I.K., McKendrick, L., Morley, S.J. y Jackson, R.J. (2001). Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *The Journal of Virology*, 75, pp: 7854-7863.
- Aragonès, L., Bosch, A. y Pintó, R.M. (2008). Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *The Journal of Virology*, 82, pp.: 1688-1700.
- Aragonès, L., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A. y Pintó, R.M. (2010). Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid. *PLoS Pathogens*, 6, pp: e1000797.
- Atmar, R. (2010). Noroviruses: State of the art. *Food and Environmental Virology*, 2, pp: 117-126.
- Beuret, C., Baumgartner, A., y Schluep, J. (2003). Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, pp.: 2292-2297.
- Boxman, I.L., Tilburg, J.J., te Loeke, N.A., Vennema, H., Jonker, K., de, B.E. y Koopmans, M. (2006). Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 108, pp: 391-396.

- Boxman, I. (2010). Human enteric viruses occurrence in shellfish from European markets. *Food and Environmental Virology*, 2, pp: 156-166.
- Brown, E.A., Zajac, A.J. y Lemon, S.M. (1994). In vitro characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *The Journal of Virology*, 68, pp: 1066-1074.
- Costa-Mattioli, M., Cristina, J., Romero, H., Perez-Bercof, R., Casane, D., Colina, R., Garcia, L., Vega, I., Glikman, G., Romanowsky, V., Castello, A., Nicand, E., Gassin, M., Billaudel, S. y Ferre, V. (2002). Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *The Journal of Virology*, 76, pp: 9516-9525.
- Costafreda, M.I., Bosch, A. y Pinto, R.M. (2006). Development, evaluation, and standardization of a real-time taqman reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, pp: 3846-3855.
- Croci, L., Losio, M.N., Suffredini, E., Pavoni, E., Di Pasquale, S., Fallacara, F. y Arcangeli, G. (2007). Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic Sea. *International Journal of Food Microbiology*, 114, pp: 252-257.
- Deng, M.Y., Day, S.P. y Cliver, D.O. (1994). Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, pp: 1927-1933.
- Di Pinto, A., Forte, V.T., Tantillo, G.M., Terio, V. y Buonavoglia, C. (2003). Detection of hepatitis A virus in shellfish (*Mytilus galloprovincialis*) with RT-PCR. *Journal of Food Protection*, 66, pp: 1681-1685.
- Domingo, E. y Vennema, H. (2008). Viral evolution and its relevance for food-borne virus epidemiology. En libro: *Foodborne Viruses: Progress and challenges*. M. Koopmans, M., Cliver, D.O. y Bosch, A. Washington DC, ASM Press, pp: 147-169.
- Duizer, E., Schwab, K.J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Koopmans, M.P. y Estes, M.K. (2004). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*, 85, pp: 79-87.
- FAO/WHO (2008). Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Virus in food: Scientific advice to support risk management activities. Disponible en: http://www.fao.org/ag/AGN/agns/jemra/Viruses_in_food_MRA.pdf. [acceso: 15-7-11].
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. y Ball, L.A. (2005). Virus taxonomy. En libro: *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York, Elsevier Academic Press.
- FDA/CFSAN (1992). Food and Drug Administration/Centre for Food Safety and Applied Nutrition. Hepatitis A virus. Disponible en: <http://seafoodhaccp.com/SeafoodData/BadBugBook/CHAP31.HTML> [acceso: 15-7-11].
- Flannery, J., Keaveney, S. y Dore, W. (2009). Use of FRNA bacteriophages to indicate the risk of norovirus contamination in Irish oysters. *Journal of Food Protection*, 72, pp: 2358-2362.
- Glass, R.I., Parashar, U.D. y Estes, M.K. (2009). Norovirus gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*, 361, pp: 1776-1785.
- Guix, S., Asanaka, M., Katayama, K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Atmar, R.L. y Estes, M.K. (2007). Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *The Journal of Virology*, 81, pp: 12238-12248.
- Hollinger, F.B. y Emerson, S.U. (2007). Hepatitis A virus. En libro: *Fields Virology*. 5th ed. Knipe, D.M. y Howley, P.M. Filadelfia. Lippincott Williams and Wilkins, pp: 911-947.
- Jansen, R.W., Newbold, J.E. y Lemon, S.M. (1988). Complete nucleotide sequence of a cell culture-adapted variant of hepatitis a virus: Comparison with wild-type virus with restricted capacity for in vitro replication. *Virology*, 163, pp: 299-307.
- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N. y Katayama, K. (2003). Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, pp: 1548-1557.
- Koopmans, M. (2005). Outbreaks of viral gastroenteritis: what's new in 2004? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 18, pp: 295-299.

- Kroneman, A., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., Van Duynhoven, Y., Gray, J., Iturriza, M., Bottiger, B., Falkenhorst, G., Johnsen, C., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Kuusi, M., Pothier, P., Gallay, A., Schreier, E., Koch, J., Szucs, G., Reuter, G., Krisztalovics, K., Lynch, M., McKeown, P., Foley, B., Coughlan, S., Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., Vainio, K., Isakbaeva, E., Poljsak-Prijatelj, M., Grom, A.H., Bosch, A., Buesa, J., Fauquier, A.S., Hernandez-Pezzi, G., Hedlund, K.O. y Koopmans, M. (2008). Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *Journal of Public Health*, 30, pp: 82-90.
- Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E. y Pommepuy, M. (2000). Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, pp: 3241-8.
- Le Guyader, F.S., Neill, F.H., Dubois, E., Bon, F., Loisy, F., Kohli, E., Pommepuy, M. y Atmar, R.L. (2003). A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 87, pp: 107-12.
- Le Guyader, F.S., Loisy, F., Atmar, R.L., Hutson, A.M., Estes, M.K., Ruvoen-Clouet, N., Pommepuy, M. y Le Pendu, J. (2006a). Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerging Infectious Diseases*, 12, pp: 931-936.
- Le Guyader, F.S., Bon, F., DeMedici, D., Parnaudeau, S., Bertone, A., Crudeli, S., Doyle, A., Zidane, M., Suffredini, E., Kohli, E., Maddalo, F., Monini, M., Gallay, A., Pommepuy, M., Pothier, P. y Ruggeri, F.M. (2006b). Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, pp: 3878-3882.
- Le Guyader, F.S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommepuy, M. y Atmar, R.L. (2009). Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, pp.: 618-624.
- Le Guyader, F.S., Krol, J., mbert-Balay, K., Ruvoen-Clouet, N., Desaubliaux, B., Parnaudeau, S., Le Saux, J.C., Ponge, A., Pothier, P., Atmar, R.L. y Le, P.J. (2010). Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, pp: 915-920.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M. y Le Guyader, F.S. (2005). Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virology Methods*, 123, pp: 1-7.
- Lowther, J.A., Henshilwood, K. y Lees, D.N. (2008). Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. *Journal of Food Protection*, 71, pp: 1427-1433.
- Lowther, J.A., Avant, J.M., Gizynski, K., Rangdale, R.E. y Lees, D.N. (2010) Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. *Journal of Food Protection*, 73, pp: 305-311.
- Maalouf, H., Zakhour, M., Le Pendu, J., Le Saux, J.C., Atmar, R.L. y Le Guyader, F.S. (2010). Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, pp: 5621-5630.
- Mymrel, M., Berg, E.M.M., Rimstad, E. y Grinde, B. (2004). Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, pp: 2678-2684.
- Perez-Sautu, U., Costafreda, M.I., Cayla, J., Tortajada, C., Lite, J., Bosch, A. y Pintó, R.M. (2011). Hepatitis A virus vaccine escape variants and potential new serotype emergence. *Emerging Infectious Diseases*, 17, pp: 734-738.
- Pintó, R.M. y Bosch, A. (2008) Rethinking virus detection in food. En libro: *Foodborne viruses: Progress and challenges*. Koopmans, M., Cliver, D.O. y Bosch, A. Washington DC, ASM Press, pp: 171-188.
- Pintó, R.M., Costafreda, M.I. y Bosch, A. (2009). Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, pp: 7350-7355.
- Polo, D., Vilarino, M.L., Manso, C.F. y Romalde, J.L. (2010). Imported mollusks and dissemination of human enteric viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 16, pp: 1036-1038.
- Rezende, G., Roque-Afonso, A.M., Samuel, D., Gigou, M., Nicand, E., Ferre, V., Dussaix, E., Bismuth, H. y Feray, C. (2003) Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection. *Hepatology*, 38, pp: 613-8.

- Robertson, B.H., Jansen, R.W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O.V., Siegl, G., Widell, A., Margolis, H.S., Isomura, S., Ito, K., Ishizu, T., Moritsugu, Y. y Lemon, S.M. (1992). Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *Journal of General Virology*, 73, pp: 1365-1377.
- Romalde, J.L., Area, E., Sanchez, G., Ribao, C., Torrado, I., Abad, X., Pinto, R.M., Barja, J.L. y Bosch, A. (2002). Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *International Journal of Food Microbiology*, 74, pp: 119-130.
- Sanchez, G., Bosch, A. y Pinto, R.M. (2003). Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *Journal of Virology*, 77, pp: 452-459.
- Siebenga, J.J., Vennema, H., Duizer, E. y Koopmans, M.P. (2007a). Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, The Netherlands, 1994-2005. *Emerging Infectious Diseases*, 13, pp: 144-146.
- Siebenga, J.J., Vennema, H., Renckens, B., de Bruin, E., van der Veer, B., Siezen, R.J. y Koopmans, M. (2007b). Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *Journal of Virology*, 81, pp: 9932-9941.
- Straub, T.M., Höner zu Bentrup, K., Orosz-Coghlan, P.O., Dohnalkova, A., Mayer, B.K., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Bruckner, C.J., Gerba, C.P., Abbaszadegan, M. y Nickerson, C.A. (2007). In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases*, 13, pp: 396-403.
- Suffredini, E., Corrain, C., Arcangeli, G., Fasolato, L., Manfrin, A., Rossetti, E., Biazzi, E., Mioni, R., Pavoni, E., Losio, M.N., Sanavio, G. y Croci, L. (2008). Occurrence of enteric viruses in shellfish and relation to climatic-environmental factors. *Letters in Applied Microbiology*, 47, pp: 467-474.
- Terio, V., Martella, V., Moschidou, P., Di Pinto, P., Tantillo, G. y Buonavoglia, C. (2010). Norovirus in retail shellfish. *Food Microbiology*, 27, pp: 29-32.
- Teunis, P.F., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J. y Calderon, R.L. (2008). Norwalk virus: how infectious is it? *Journal of Medical Virology*, 80, pp: 1468-1476.
- Vilarino, M.L., Le Guyader, F.S., Polo, D., Schaeffer, J., Krol, J. y Romalde, J.L. (2009). Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. *International Microbiology*, 12, pp: 145-151.
- Whetter, L.E., Day, S.P., Elroystein, O., Brown, E.A. y Lemon, S.M. (1994). Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *Journal of Virology*, 68, pp: 5253-5263.

Colaboración

Evaluación del riesgo del consumo de derivados cárnicos frescos por determinados grupos de población en relación con la modificación del Real Decreto 1376/2003, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor

Elena Carrasco Jiménez, Rosa M^a García Gimeno, Fernando Pérez Rodríguez, Antonio Valero Díaz y Gonzalo Zurera Cosano.
Grupo de investigación de microbiología predictiva (HIBRO) de la Universidad de Córdoba. Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Campus de Rabanales, 14014 Córdoba.

107

revista del comité científico nº 14

Resumen

El Real Decreto 728/2011, de 20 de mayo, modifica el artículo 4 del Real Decreto 1376/2003, de 7 de noviembre, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor; artículo en el que se establecía una excepción en el suministro de preparados cárnicos frescos a los establecimientos de comidas preparadas autorizados.

Este trabajo valora el riesgo derivado de dichos preparados cárnicos frescos entre la población consumidora que acude a bares y restaurantes y la que se encuentra en geriátricos, hospitales, colegios y guarderías a los cuales se mantiene restringido el suministro de dichos derivados cárnicos.

Los resultados obtenidos muestran la existencia de diferencias entre los colectivos de población estudiados en cuanto a la magnitud de la respuesta morbosa ante la ingestión de idénticas dosis de microorganismos patógenos. El número de enfermos estimados es mayor en el caso del colectivo de geriátricos, guarderías, colegios y hospitales en comparación con el de bares y restaurantes, tanto para los serotipos de *Salmonella* estudiados como para *Listeria monocytogenes*.

Palabras clave

Preparados cárnicos frescos, comercio al por menor, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, grupos de riesgo.

Risk assessment for the consumption of fresh meat products for certain population groups in relation to the modification made in the Royal Decree 1376/2003, which establishes the health conditions for production, storage and marketing of fresh meats and meat products in retail establishments.

Abstract

The Royal Decree 728/2011, of 20 May, modifies article 4 of the Royal Decree 1376/2003, of 7th November, which establishes the sanitary conditions for production, storage and marketing of fresh meat and meat products at retail establishments. This article established one exception with respect to the supply of fresh meat preparations for authorised food preparation establishments.

The present study evaluates and compares the risk derived from the aforementioned fresh meat preparations amongst the consumers that eat in bars and restaurants and that which eats in nursing homes, hospitals, schools and nurseries; to which the supply of the aforementioned meat products remains restricted.

The results revealed differences between the population groups under study regarding the magnitude of the pathological response in light of the consumption of identical doses of pathogenic micro-organisms. The estimated number of patients within the group of people which eat in residential homes, hospitals, schools and nurseries is greater than that of the group which eat in bars and restaurants, for both the serotypes *Salmonella* studied and for *Listeria monocytogenes*.

Key words

Fresh meat derivatives, retail sale, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, at-risk groups.

Introducción

El Real Decreto 728/2011, de 20 de mayo, modifica al Real Decreto 1376/2003, de 7 de noviembre, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor.

En el Real Decreto 1376/2003 se establecía una excepción en el suministro de derivados cárnicos a los establecimientos de comidas preparadas autorizados; esta excepción lo constituía el grupo de los preparados cárnicos frescos, aspecto que el Real Decreto 728/2011 viene a modificar. Entre los establecimientos de comidas preparadas se encuentran las residencias, geriátricos, hospitales, guarderías y colegios, en los que encontramos los colectivos de mayor riesgo como pueden ser las personas mayores, los enfermos y los niños.

La modificación citada se recoge en un artículo único del Real Decreto 728/2011, que afecta al segundo párrafo del artículo 4 de dicho Real Decreto 1376/2003 y que se sustituye por el siguiente¹:

"Los establecimientos autorizados, conforme a lo indicado anteriormente, podrán suministrar los productos contemplados en este Real Decreto a establecimientos de comidas preparadas autorizados, siempre que:

1. El establecimiento suministrador disponga de instalaciones y equipos adecuados y proporcionales para la elaboración higiénica de su volumen de producción.
2. Se limite a las carnes definidas en el apartado 1 del artículo 2 y a los derivados cárnicos definidos en el apartado 3 del artículo 2, excepto los preparados cárnicos frescos definidos en el párrafo a).1º. de dicho apartado. *Y, en el caso de suministros a bares y restaurantes, se limite a las carnes definidas en el apartado 1 del artículo 2 y a los derivados cárnicos definidos en el apartado 3 del artículo 2.*
3. No suministren a establecimientos sujetos a inscripción en el Registro General Sanitario de Alimentos.
4. Su distribución se realice dentro del ámbito del municipio donde esté ubicado el establecimiento o bien en la unidad sanitaria local, zona de salud o territorio de iguales características y finalidad que defina la autoridad competente correspondiente."

Con esta modificación se permiten ciertos suministros a bares y restaurantes, manteniendo la restricción para el suministro a establecimientos que no sean tales, como es el caso de las residencias, geriátricos, hospitales, guarderías y colegios, basándose en que éstos son establecimientos en los que se encuentran colectivos de mayor riesgo desde un punto de vista de seguridad alimentaria.

En este trabajo se valorará la magnitud del riesgo que pueda producirse por el consumo de derivados cárnicos frescos descritos en el párrafo a).1º. del apartado 3 del artículo 2 del Real Decreto 1376/2003, entre la población consumidora que acude a bares y restaurantes y la que se encuentra en geriátricos, hospitales, colegios y guarderías a los cuales se mantiene restringido el suministro de dichos derivados cárnicos desde los establecimientos de comercio al por menor contemplados en el Real Decreto objeto de la modificación.

¹En cursiva el nuevo texto.

Aplicación de la metodología de evaluación del riesgo a la situación planteada

El principal propósito de una Evaluación del Riesgo (ER) es apoyar/fundamentar decisiones. El proceso de ER debe comenzar identificando el problema que debe ser tratado o la decisión que debe tomarse por parte del gestor del riesgo. La ER debe proporcionar esta información requerida.

1. Planteamiento del problema

En el caso que se nos presenta, la modificación del artículo 4 del Real Decreto 1376/2003, introduce la liberalización del suministro de determinados preparados cárnicos frescos (descritos en el párrafo a).1º. del apartado 3 del artículo 2) procedentes de establecimientos minoristas, a bares y restaurantes y mantiene la restricción de dicho suministro a geriátricos, hospitales, colegios y guarderías, sin estar sustentada por una metodología objetiva de Análisis de Riesgos.

Para dar respaldo técnico a esta liberalización y evitar la arbitrariedad en que podría incurrirse al concluir que dicha liberalización es racional aplicarla a bares y restaurantes y no a los otros colectivos, cualquier enfoque que se decida aplicar, debería pivotar sobre la valoración de la respuesta que pueda producirse en los dos colectivos de consumidores implicados frente al mismo tipo de peligro microbiológico que pueda ir vehiculado en estos derivados cárnicos.

El presente informe proporciona el fundamento científico que permite diferenciar la magnitud del riesgo que pueda derivarse del consumo de dichos preparados cárnicos frescos entre la población consumidora que acude a bares y restaurantes y la que se encuentra en geriátricos, guarderías, colegios y hospitales, que son considerados colectivos de mayor riesgo. En definitiva, se comprobará si la respuesta producida en los diferentes colectivos es o no diferente y, en su caso, si esa respuesta debe ser considerada de mayor o menor riesgo para alguno de los colectivos mencionados. Para tal fin, el presente informe técnico estará basado en la metodología de ER en el marco del Análisis de Riesgos descrita por FAO/WHO (1995).

Para abordar un estudio de ER es necesario disponer de datos suficientes y de calidad. La obtención de datos para el desarrollo de una ER es probablemente el aspecto que más tiempo lleva de todas las tareas que se han de llevar a cabo. Para la elaboración del presente informe, se precisa información epidemiológica diversa sobre los brotes relacionados con estos productos cárnicos; datos de prevalencia y concentración de microorganismos patógenos e indicadores de higiene en estos productos; datos de consumo en los sectores afectados (bares, restaurantes, geriátricos, comedores escolares, hospitales, etc.); información sobre el grado de cumplimiento de los sistemas de autocontrol por parte de los operadores económicos, etc.

La dispersión de la tenencia de esa información, dificulta la tarea de acceder a la misma y, en consecuencia, la imposibilidad de disponer de dichos datos en tiempo y forma, lo que lleva a la búsqueda y utilización de datos procedentes de la bibliografía científica que permita hacer aproximaciones y/o supuestos que sustenten el presente documento. Según la CAC (1999), cuando tengan lugar tales limitaciones, es importante, en aras de la transparencia, que éstas queden descritas formalmente en el informe, incluyendo las repercusiones que tienen las limitaciones de recursos en la ER.

Con independencia de esto, debe tenerse en cuenta que, para que concurra un determinado peligro microbiológico en estos derivados cárnicos a niveles que puedan ser constitutivos de riesgo, tendría

que producirse alguna desviación en el cumplimiento de las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados establecidas en el Real Decreto 1376/2003. Adicionalmente podría ocurrir que el tratamiento térmico aplicado durante la preparación culinaria de estos productos cárnicos no fuese totalmente eficaz en la eliminación de los microorganismos presentes, o bien, que aun siendo eficiente, se diera una contaminación cruzada post-procesado y/o un mantenimiento inadecuado del producto cocinado previo a su consumo, que permitan la incorporación y el crecimiento, respectivamente, de los microorganismos patógenos en estos productos. Entendemos que sólo unas prácticas inadecuadas de manipulación durante su preparación culinaria y/o durante su mantenimiento previo al consumo, darán como resultado la permanencia y el crecimiento de microorganismos patógenos en estos productos cárnicos, ya que la aplicación de un código de Buenas Prácticas Higiénicas (BPH) y Buenas Prácticas de Elaboración (BPE), eliminarían o reducirían, de manera efectiva, esta posibilidad.

Este informe no entra en valoraciones sobre las posibles diferencias de las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de carnes frescas y sus derivados entre los diferentes tipos de establecimientos suministradores, considerando que se parte de condiciones sanitarias similares en grado de efectividad, para comprobar si la respuesta que pueda producirse en los colectivos de consumidores implicados, frente al mismo tipo y nivel de peligro microbiológico vehiculado en estos derivados cárnicos, es o no significativamente diferente y, en su caso, si esa respuesta debe ser considerada de mayor o menor riesgo para alguno de los mencionados colectivos. Para ello se ha seguido la metodología de ER siguiendo el enfoque de diferentes autores (Buchanan et al., 2000) (FAO/WHO, 2004) (Teunis et al., 2010), que utilizan modelos dosis-respuesta mecanicistas y/o empíricos que nos permitirán diferenciar, en su caso, la magnitud de la respuesta en los distintos colectivos.

2. Etapas de la evaluación cuantitativa del riesgo en la situación planteada

Identificación del peligro

La identificación del peligro se define como la "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 grupo de alimentos en particular" (CAC, 1999). En el caso que se nos presenta, nos limitaremos a valorar aquellos peligros microbiológicos de naturaleza bacteriana que pueden tener mayor interés en los preparados cárnicos frescos descritos en el párrafo a).1º. del apartado 3 del artículo 2 y que son representativos para el objeto del presente informe (*Salmonella* y *Listeria monocytogenes*). Para su elección nos hemos apoyado en la bibliografía científica.

Salmonella

La salmonelosis constituye hoy en día una de las enfermedades de origen alimentario con mayor incidencia pese a los avances conseguidos en materia de higiene alimentaria, tanto a nivel industrial como a nivel de producción primaria. El reservorio común de *Salmonella* es el tracto intestinal de una amplia gama de animales domésticos y salvajes, que resultan en multitud de alimentos de origen animal y vegetal como fuentes de infección. En general, en la Unión Europea (UE), *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Typhimurium* son los serotipos más frecuentemente asociados con la enfermedad en

humanos; específicamente, *S. Enteritidis* se asocia a menudo con el consumo de huevos contaminados y carne de aves de corral, mientras que los casos por *S. Typhimurium* están en su mayoría causados por el consumo de carne contaminada de cerdo, aves de corral y de vacuno.

A menudo, la transmisión de *Salmonella* tiene lugar cuando el patógeno se introduce en las áreas de preparación de alimentos cuyas condiciones permiten su multiplicación, como son temperaturas inadecuadas de almacenamiento, cocción insuficiente o contaminación cruzada de alimentos listos para consumo (alimentos RTE). Por otra parte, el patógeno también puede transmitirse por contacto directo con animales o humanos infectados o con ambientes contaminados por heces.

Desde el año 2004, se ha observado en la UE una disminución paulatina en el número de notificaciones de salmonelosis desde 195.947 casos en el año 2004 hasta 109.844 casos en el año 2009, siendo en 2009 la incidencia de 23,7 casos/100.000 habitantes (EFSA/ECDC, 2011). *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* fueron los serotipos más frecuentemente asociados a toxiinfecciones en humanos.

La distribución por edades de los casos de *Salmonella* en 2009 se asemeja mucho a la observada en años anteriores (Figura 1). Se dispone de los datos de edad en un 93.3% de los 108.614 casos confirmados. La mayor tasa de notificación se corresponde con el rango de edad 0-4 años, siendo 112,4 casos/100.000 habitantes. Aunque se ha observado cierta reducción en esta tasa en comparación con el año 2008 (118,8 casos/100.000 habitantes), es aún tres veces superior a la tasa observada en el grupo de edad 5-14 años, y entre seis y nueve veces superior a la tasa del grupo de edad de más de 15 años.

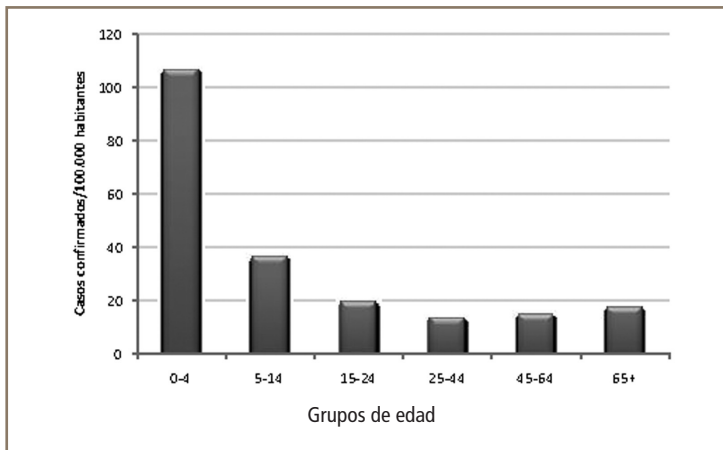


Figura 1. Distribución de casos de salmonelosis por edad en la Unión Europea. Año 2009.

En España, el número de casos de salmonelosis notificados ha disminuido notablemente desde el año 2004 (7.109 casos) hasta el año 2009 (4.304 casos), con una tasa de notificación en 2009 de 37,6 casos/100.000 personas.

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes es un microorganismo patógeno cuya enfermedad, listeriosis, presenta un ratio de mortalidad elevado que varía entre el 20 y el 50% (Rocourt y Bille, 1997) (Vázquez-Boland et al., 2001). Sin embargo, no siempre se reconoce su impacto en salud pública, probablemente debido al carácter esporádico de la enfermedad en comparación con otras enfermedades alimentarias comunes de origen bacteriano como es la salmonelosis. Hay consenso entre los expertos en listeriosis en que existe una subestimación en el número de casos de enfermedad debido a que se trata de una enfermedad no notificable en muchos países, incluido España, y a la carencia de programas de vigilancia adecuados para esta enfermedad.

El género *Listeria* comprende actualmente seis especies, siendo los casos de listeriosis en humanos causados casi exclusivamente por la especie *Listeria monocytogenes*. *Listeria* spp. es un microorganismo ubicuo ampliamente distribuido en el medio ambiente, especialmente en materia vegetal y en suelos. Los principales reservorios de *Listeria* spp. son suelo, forraje y agua, aunque también actúan como reservorios los animales domésticos y salvajes. Se asume que la principal vía de transmisión a humanos y animales es el consumo de alimentos o piensos contaminados. Sin embargo, la infección también se puede transmitir directamente de animales infectados a humanos, así como entre seres humanos. *Listeria* es capaz de multiplicarse a temperaturas tan bajas como 2-4 °C, que hace que su presencia en alimentos RTE con una vida comercial relativamente larga o en alimentos no cocinados adecuadamente, sea especialmente peligrosa.

En el 2009, la incidencia de listeriosis fue de 0,36 casos/100.000 habitantes en la UE (EFSA/ECDC, 2011). Esto supone un incremento con respecto al año 2008 del 14%, año en que se registró una tasa de notificación de 0,30 casos/100.000 personas. La distribución por edades de los casos de listeriosis en 2009 es similar a la observada en años anteriores (Figura 2). La tasa de notificación es mayor en personas con más de 65 años (1,1 casos por 100.000 habitantes), siendo este grupo de edad el mayormente afectado, con el 58,5% de los casos. Cabe destacar que la mayoría de los casos en el tramo de edad entre 0-4 años de edad (88,5%) ocurrió en recién nacidos (<1 año).

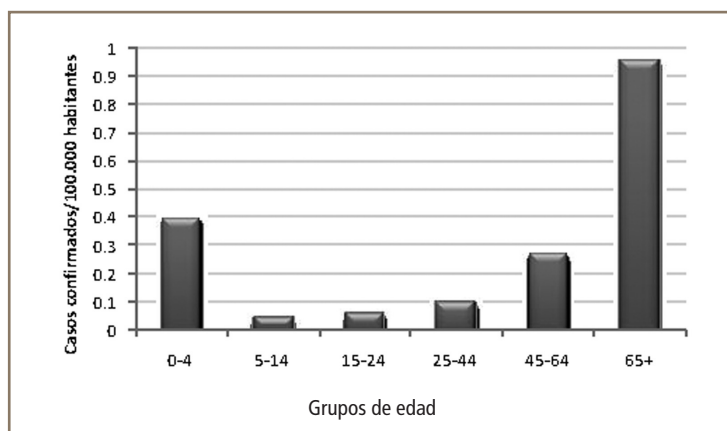


Figura 2. Distribución de casos de listeriosis por edad en la Unión Europea. Año 2008.

Datos disponibles del año 2008 indican que sólo en 34 de los 1.381 de los casos a nivel europeo se halló la ruta de transmisión. De los 34, 32 personas sufrieron infección por *Listeria monocytogenes* vía alimento, y dos casos se asociaron al embarazo. El resultado de la enfermedad se conoció prácticamente en la mitad de los casos (653 casos). De éstos, 134 personas murieron, perteneciendo 87 personas al grupo de mayores de 65 años.

En España, el número de casos confirmados en 2009 fue 121, con una tasa de notificación de 1,06/100.000 personas. Aunque la incidencia de listeriosis es relativamente baja en comparación con otras toxiinfecciones alimentarias, como se ha comentado antes, la tasa de mortalidad es especialmente elevada (Rodríguez Ferri, 1992). Esto, junto a su elevada prevalencia en carnes frescas, confiere a este patógeno un especial interés para su inclusión en la presente ER.

Evaluación de la exposición

La evaluación de la exposición es la "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" (CAC, 1999). Como se ha comentado anteriormente, son cuatro las áreas en las que se precisa profundizar para llevar a cabo una evaluación cuantitativa de la exposición: (i) población expuesta; (ii) la frecuencia de consumo del alimento en cuestión; (iii) la frecuencia de exposición de los consumidores al peligro existente en el alimento; y (iv) el nivel de contaminación del alimento en el momento de consumo.

Es obvio que a medida que aumenta el valor de cualquiera de las cuatro variables anteriores, aumenta la probabilidad de exposición al peligro. Por tanto, un acopio de datos cuantitativos fieles a la realidad ayudaría a cuantificar esta probabilidad y compararla con otros peligros y/o alimentos. No obstante, la variabilidad e incertidumbre de las cuatro variables es muy amplia, y en muchos casos, no se dispone de datos, por lo que se ha definido un escenario base que servirá para ilustrar distintos supuestos teóricos.

Dicho escenario representa un peor caso de contaminación del producto. Es decir, se supone un lote contaminado al 100% (por los microorganismos identificados anteriormente) que se suministra a distintos colectivos: bares y restaurantes (BR); geriátricos, guarderías, colegios y hospitales (GGCH). Téngase en cuenta que cuando ocurre un brote, el vehículo implicado lo constituye normalmente una partida contaminada de alimento. El escenario parte de los siguientes supuestos:

- (i) Con relación a la población expuesta, se definen dos poblaciones objeto de estudio: la población que acude a BR y la población perteneciente a GGCH, ambas formadas por 1.000 personas. La población expuesta en BR se considerará representativa de la población española (INE, 2011). Los datos actuales de la población española distribuidos por grupos de edad se muestran en la Tabla 1. Asimismo, se muestra en la misma Tabla el porcentaje asociado a estos grupos de edad y el número de personas de cada grupo que, por azar, acudirían a BR con una afluencia media de 1.000 personas al día.

Rango de edad (años)	Población española (x1.000)	Porcentaje	Población 1.000 personas
De 0 a 1	497	1,1 %	11
De 1 a 4	1.988	4,3 %	43
De 5 a 11	3.216	7,0 %	70
De 12 a 64	32.574	70,5 %	705
≥65	7.878	17,1 %	171
Total	46.153	100,0 %	1.000

De entre la población que acude a BR se considera que la población comprendida en los rangos de 0-1, 1-5 y ≥65 años es inmunosusceptible en el caso de *Salmonella*, mientras que para *Listeria monocytogenes* son los grupos de edad <1 y >65 los considerados inmunosusceptibles. El resto de población que acude a BR se considera población no susceptible o inmunocompetente. En GGCH la totalidad de la población se ha considerado inmunosusceptible.

- (ii) En lugar de considerar una determinada frecuencia de consumo del preparado cárnico, se considerará una sola ingestión del mismo por persona en ambas poblaciones.
- (iii) La exposición del consumidor al posible peligro en el alimento depende, por un lado, de la ración (a mayor tamaño de ración, mayor probabilidad de ingerir el posible patógeno), y por otro lado, de la prevalencia del patógeno en el alimento. En el escenario base, se prescinde de datos de tamaño de ración; puesto que el interés de conocer el tamaño de ración estriba en el cálculo de la dosis, y puesto que se seleccionarán varios niveles de dosis, es completamente innecesario considerar el tamaño de ración. En cuanto a la prevalencia del patógeno, como se ha comentado anteriormente, se asumirá que el 100% del producto está contaminado.
- (iv) El nivel de contaminación del alimento en el momento de consumo, junto con el tamaño de ración, tienen una relación directa con la dosis ingerida de patógeno. Los datos españoles disponibles más recientes proceden del informe sobre tendencias y fuentes de zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de origen alimentario del año 2009 (AESAN, 2009). Estos datos se refieren a prevalencia (porcentaje de muestras positivas), mientras que los datos de concentración de *Salmonella* y *L. monocytogenes* son, en el primer caso, inexistentes, y en el segundo, de naturaleza cualitativa. Esta carencia dificulta la tarea de cuantificar cuál es la posible concentración en el alimento a nivel de consumidor final. Por ello, se han supuesto varios niveles de dosis, desde 1 ufc hasta 10⁸ ufc/ración (Tabla 2).

1	10	50	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
---	----	----	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

Caracterización del peligro

La caracterización del peligro consiste en la "evaluación cuantitativa o cualitativa de la naturaleza de los efectos nocivos para la salud asociados con el peligro en cuestión. Para los fines de la evaluación de riesgos microbiológicos, son objeto de interés los microorganismos y/o sus toxinas" (CAC, 1999). Cualquier consideración sobre la relación dosis-respuesta debe tener en cuenta los variados mecanismos de virulencia asociados a los diferentes patógenos bacterianos alimentarios. Sin un adecuado conocimiento de cómo el patógeno causa la enfermedad, es difícil evaluar e interpretar el efecto de las características del hospedador y del propio alimento sobre el grado de virulencia del microorganismo.

Existen tres componentes a medir como tipo de respuesta: la infección, la morbilidad y la mortalidad. La infección se refiere a la colonización del tracto intestinal por parte de las bacterias patógenas. Los términos morbilidad y mortalidad significan respectivamente la proporción de individuos infectados que presentan síntomas o que mueren como resultado de los síntomas provocados por la enfermedad.

La capacidad de un microorganismo de producir enfermedad está asociada a la presencia de uno o varios factores de virulencia (síntesis de toxinas, grado de adherencia, habilidad para resistir la respuesta inmune del hospedador, resistencia a condiciones adversas y a antimicrobianos, etc.). A menudo estas características están asociadas a diferentes genes que pueden encontrarse en las especies bacterianas.

Además de estas características específicas de virulencia asociadas a cepas patógenas, el número de células ingeridas puede influir de forma notoria sobre la frecuencia y la extensión de los efectos adversos producidos por el patógeno. Un incremento de la dosis ingerida a través de un alimento, dará generalmente como resultado un aumento del porcentaje de población que llegará a infectarse o en su caso, enfermar produciéndose a su vez una disminución del tiempo necesario para superar las barreras del hospedador y causar un daño fisiológico. Esta relación suele ser lineal en un cierto rango de dosis hasta llegar a una fase estacionaria donde altos niveles de dosis no producen un incremento significativo de la probabilidad de infección. La relación entre dosis inicial y severidad de la enfermedad no está tan bien definida. Así, mientras que para *Campylobacter jejuni* la tasa de infección está relacionada con la dosis, no lo es así para la tasa de morbilidad (Medema et al., 1996). Por otra parte Coleman y Marks (1998) observaron una mayor tasa de severidad de la infección por *Salmonella* cuanto mayor es la dosis.

Para Buchanan et al. (2000), ambas conclusiones pueden ser correctas, si se tiene en cuenta que la respuesta individual a un patógeno es altamente dependiente del estado fisiológico del individuo, de manera que es posible que las infecciones severas sólo se produzcan en individuos susceptibles (inmunodeprimidos).

Salmonella es un microorganismo de gran importancia sanitaria transmitido por los alimentos. El reservorio habitual de *Salmonella* lo constituye el tracto intestinal de diversos animales, lo que hace que esté presente en una gran variedad de alimentos. *Salmonella* es causante de 1.4 millones de infecciones anuales, 15.000 hospitalizaciones y 400 muertes (Voetsch et al., 2004). La salmonelosis humana se caracteriza generalmente por la aparición brusca de fiebre, dolor abdominal, náuseas y a veces vómitos. Los síntomas suelen ser leves y la mayoría de las infecciones sanan, con una duración de unos días. Sin embargo, en algunos pacientes, la infección puede ser más grave y la deshidratación

asociada puede poner en peligro la vida del enfermo (Gonzales-Barrón et al., 2010). En estos casos y en los que *Salmonella* provoca infección del torrente sanguíneo, es esencial el tratamiento con antimicrobianos. La salmonelosis también se ha asociado con secuelas a largo plazo y a veces crónicas, como por ejemplo, la artritis reactiva.

Listeria monocytogenes es un microorganismo patógeno transmitido por los alimentos que causa enfermedad (listeriosis), con mayor probabilidad en individuos con el sistema inmunitario debilitado. Las diversas manifestaciones clínicas asociadas a la listeriosis pueden agruparse en dos categorías: listeriosis invasiva y listeriosis no invasiva. La listeriosis invasiva se refiere a los casos en que una infección inicial del tejido intestinal por *L. monocytogenes* deriva en la invasión de partes del organismo que habitualmente son estériles, como el útero grávido, el sistema nervioso central o la sangre, o combinaciones de éstos. La listeriosis invasiva se caracteriza por una tasa de letalidad alta, de 20 a 30% (Mead et al., 1999) y las infecciones pueden producir secuelas (McLauchlin, 1997), aunque no se determina sistemáticamente la incidencia de éstas (Rocourt, 1996). Los casos de listeriosis no invasiva (conocida como gastroenteritis febril por listerias) se han observado en algunos brotes en los que la mayoría de los casos presentaron síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgia, tras un período de incubación corto (Aureli et al., 2000) (Dalton et al., 1997). Estos brotes se han producido generalmente tras la ingestión de dosis altas de *L. monocytogenes* por personas previamente sanas. No se conocen ni la incidencia ni los factores que ocasionan la aparición de esta forma no invasiva de la enfermedad.

En humanos, la listeriosis severa ocurre principalmente en fetos, niños, ancianos y personas inmunodeprimidas. Los síntomas varían desde síntomas gripales suaves y diarrea hasta infecciones letales caracterizadas por septicemia y meningoencefalitis. En mujeres embarazadas, la infección puede extenderse al feto, que puede morir en el útero provocando aborto o llegar a nacer gravemente enfermo. La listeriosis se sitúa entre las causas más importantes de muerte de entre las infecciones transmitidas por alimentos en los países industrializados. La tasa de muerte por listeriosis ha sido también estudiada por la FDA (2003). En este trabajo, obtuvieron diferentes ratios "enfermedad/muerte" para diferentes sub-poblaciones, donde el mayor ratio correspondió al grupo de neonatos como se puede observar en Tabla 3.

Tabla 3. Estimaciones del número de casos de listeriosis basados en informes de la red Norteamericana FoodNet

Subpoblación	Estimación de casos anuales		Casos notificados en periodo de 4 años (FoodNet)		Ratio Enfermedad: muerte
	Casos de listeriosis	Muertes	Casos de listeriosis	Muertes	
Neonatos	216	16	38	3	12,7
Edad-Intermedia	702	67	113	10	11,3
Edad-Anciana	1.159	307	194	52	3,7
Total	2.078	390	345	65	–

De entre los factores asociados al hospedador, se encuentra la susceptibilidad individual a los patógenos bacterianos. La respuesta de la población frente a los agentes infecciosos es diversa, reflejándose ésta en términos genéticos, estado de salud, de nutrición, edad, estado inmunológico, estrés y exposición previa a dichos patógenos. En el caso de determinados peligros biológicos, parece que una exposición previa a los mismos proporciona una resistencia individual a exposiciones posteriores al mismo patógeno. Sin embargo, para muchos otros patógenos alimentarios, la inmunidad tiene una importancia limitada, ya sea porque la presencia del patógeno se restringe al tracto intestinal (*E. coli*) o bien por la gran variedad de serotipos que poseen genes de virulencia (*Salmonella*).

Hay sectores de población que ven aumentado el riesgo frente a patógenos alimentarios, en gran medida porque son grupos con la capacidad inmune disminuida. Especialmente los niños y ancianos son considerados grupos poblacionales con mayor riesgo de padecer toxiinfecciones alimentarias. Por otra parte, determinados tratamientos médicos (inmunodepresores), o estados patológicos (SIDA) que afectan negativamente la respuesta inmune o el estado general sanitario de los pacientes, pueden influenciar la incidencia o gravedad de estas infecciones alimentarias. Se estima que el sector de población inmunodeprimida, incluyendo niños y ancianos, puede representar el 20% de la población (CAST, 1994) (Gerba et al., 1996) (Smith, 1998). Sin embargo, no está claro si una disminución del sistema inmune hace a los individuos más susceptibles a una infección inicial, o si las tasas de infección para los individuos inmunodeprimidos y sanos es similar, aunque existe una mayor probabilidad de que una persona inmunodeprimida infectada enferme antes que una sana.

El último eslabón influyente en la relación dosis-respuesta lo constituye la matriz del alimento ingerido. Aunque tradicionalmente se ha considerado que las características del alimento tienen un peso relativo en la relación dosis-respuesta, en los últimos años se viene dando mayor importancia al impacto del efecto matriz en la probabilidad de enfermar. Muchos de los estudios publicados hasta la fecha se han centrado en la adaptación de los microorganismos a condiciones ácidas, lo que hace que posean una resistencia adicional que les ayuda en gran medida a superar la barrera gástrica del hospedador. Este hecho se ha demostrado con ciertos patógenos entéricos como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* o *L. monocytogenes*. Además, en el caso de *L. monocytogenes*, se ha comprobado que la exposición a condiciones ácidas tiene una influencia en la expresión de ciertos genes de virulencia, y en sus propiedades de adhesión e invasión. Hay que tener en cuenta que las propiedades físicas de los alimentos influyen sobre la relación dosis-respuesta. Así, los alimentos grasos pueden tener un efecto protector para los microorganismos ya que actúan como barrera frente al jugo gástrico. Por otro lado, la ingestión de alimentos que haga aumentar el pH del estómago hace que la barrera gástrica que presenta el hospedador se vea disminuida frente a ciertos patógenos. Este efecto puede incrementarse con el consumo de antiácidos, o sustancias que produzcan aclorhidria (disminución en la producción de ácido en el jugo gástrico). Finalmente, la ingestión de alimentos líquidos o sólidos también puede hacer variar la relación dosis-respuesta.

Para caracterizar el peligro es necesario evaluar la relación dosis-respuesta, definida como la "determinación de la relación existente entre la magnitud de la exposición (dosis) a un agente biológico, químico o físico y la gravedad y/o frecuencia de los efectos adversos para la salud (respuesta) que dicho agente produce" (CAC, 1999). Una evaluación cuantitativa de la relación dosis-respuesta precisa

del desarrollo de modelos matemáticos dosis-respuesta. A continuación se describen brevemente los modelos seleccionados para los peligros identificados *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis* y *Listeria monocytogenes*.

Modelos dosis-respuesta de *Salmonella*

La mayoría de los casos notificados de salmonelosis tienen un origen alimentario (productos cárnicos, ovoproductos, productos lácteos, etc.). Aunque se han notificado numerosos brotes asociados a *Salmonella*, la mayoría de los casos producidos son esporádicos (Voetsch et al., 2004). *Salmonella* posee una gran capacidad de colonización en el hospedador; este alto grado de infección o patogenia ha sido descrito científicamente a través de modelos dosis-respuesta basados en diferentes tipos de datos utilizados para su elaboración (ensayos sobre humanos o animales, datos procedentes de brotes etc.), y tipos de respuestas producidas (infección o enfermedad). Todos ellos establecen una serie de asunciones sobre la relación dosis-respuesta: exponencial (Rose et al., 1995), *Beta-Poisson* (Fazil, 1996) (Teunis et al., 1999) (WHO, 2003), *Gompertz* (Coleman y Marks, 1998), y modelos lineales de tres fases (Oscar, 2004). Los más utilizados son los modelos de tipo exponencial y *Beta-Poisson*, aunque otros autores han desarrollado modelos más sofisticados, como Latimer et al. (2001), que consideraron diferentes niveles de virulencia del patógeno, o Bollaerts et al. (2008), que modelaron la relación dosis-enfermedad basándose en datos epidemiológicos y considerando la especificidad entre el serotipo de *Salmonella* y el alimento.

La Evaluación de Riesgos desarrollada por el Departamento de Agricultura y Servicio de Inspección de Seguridad Alimentaria de Estados Unidos (FDA/FSIS, 1998) para *S. Enteritidis* en huevos incluyó distintos modelos dosis-respuesta de tipo *Beta-Poisson* para sectores de población inmunocompetente e inmunosusceptible. Los parámetros fueron estimados con ayuda de datos epidemiológicos e investigaciones sobre brotes de salmonelosis.

Otros autores (Buchanan et al., 2000) han propuesto un esquema compartimentado para describir la relación dosis-respuesta en el que establecen tres compartimentos en el desarrollo de la enfermedad entérica bacteriana: barrera gástrica, capacidad de adhesión/infectividad y morbilidad/mortalidad. La Tabla 4 recoge los factores más relevantes asociados a cada uno de estos compartimentos.

Tabla 4. Factores asociados a cada uno de los tres compartimentos del modelo mecanicista propuesto por Buchanan et al. (2000)

Barrera gástrica	Adhesión/Infectividad	Morbilidad/Mortalidad
pH del estómago	Capacidad de adhesión	Defensas inmunológicas
Tiempo de permanencia	Tiempo de contacto del patógeno con el epitelio	Capacidad de producir genes virulentos
Resistencia a condiciones ácidas	–	–

Trabajos más recientes constatan que muchos de los experimentos desarrollados sobre infecciones provocadas en humanos por *Salmonella* spp. se consideran inapropiados a causa de su diseño experimental, de la utilización de dosis infectivas irreales, del método de inoculación y del uso de serotipos de *Salmonella* no relacionados con toxiinfecciones en humanos. Así, la estimación del grado de patogenicidad de serotipos de *S. Typhi* no ha sido correctamente determinada debido a que se han usado otros serotipos alternativos que requerían dosis demasiado elevadas para producir enfermedad (Coleman y Marks, 1998). Así, los valores de Dosis Infecciosa 50 o DI50 (dosis ingerida necesaria para causar un 50% de probabilidad de infección) son superiores a 10^4 ufc/ración, sobreestimando en muchos casos la dosis real. Por otro lado, hay que señalar que los brotes causados por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* suelen implicar un número elevado de casos, mientras que las toxiinfecciones asociadas a otros serotipos de *Salmonella* son de carácter esporádico (Teunis et al., 2010).

Por este motivo, lo más usual es la construcción de modelos dosis-respuesta a partir de datos procedentes de brotes de salmonelosis que relacionan la dosis ingerida y la tasa de infección (número de infectados/número de personas expuestas) (Bollaerts et al., 2008).

Teunis et al. (2010) desarrollaron recientemente un modelo dosis-respuesta de *Salmonella* mediante la inclusión de parámetros que permiten estimar de forma separada la probabilidad de infección y de enfermedad. Asimismo, el modelo contempla la heterogeneidad de la dosis ingerida así como la interacción patógeno-hospedador. El modelo parte de datos recopilados de brotes de salmonelosis en diferentes países. En dicho modelo, se utilizaron como variables, por un lado, los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* y por otro lado, el grado de susceptibilidad (población inmunocompetente e inmunosusceptible). En el escenario base se procedió a la utilización de este modelo dosis-respuesta para *Salmonella*.

A continuación se presenta el desarrollo matemático del modelo, así como los resultados obtenidos para los diferentes niveles de dosis y su aplicación sobre los dos grupos de población.

En el modelo propuesto por Teunis et al. (2010), la probabilidad de exposición (P_{exp}) a un patógeno viene dada por la siguiente ecuación:

$$P_{exp}(CV_{ing}) = 1 - e^{-CV_{ing}} \quad (1)$$

donde C es la concentración del patógeno (ufc/g) y V_{ing} es la cantidad ingerida de alimento (g).

Cuando la infección surge independientemente del número de células ingeridas y éstas sobreviven dentro del organismo con una determinada probabilidad (p_m), la probabilidad de infección resultante vendrá dada por:

$$P_{inf}(CV_{ing} | p_m) = 1 - e^{-CV_{ing} \cdot p_m} \quad (2)$$

Este modelo expresa la probabilidad de infección (P_{inf}) como consecuencia de la ingestión de una dosis concreta. Según el planteamiento desarrollado, entenderemos como P_{inf} la probabilidad individual de infección (riesgo individual), mientras que la probabilidad de enfermar (P_{enf}) la calcularemos sobre un conjunto de población concreto (riesgo colectivo).

Heterogeneidad de la dosis

El modelo dosis-respuesta asume que los microorganismos no se encuentran distribuidos de forma uniforme en el alimento, sino que forman agrupaciones o "clusters". En el caso de alimentos sólidos, como los productos cárnicos, se suele presentar este tipo de distribución. En este caso, P_{exp} vendrá dada por:

$$P_{exp}(CV_{ing}, r) = 1 - \left(1 + \frac{CV_{ing}}{r}\right)^{-r} \quad (3)$$

donde r está definido como un parámetro de dispersión del modelo relacionado con la heterogeneidad de la distribución de la dosis. El valor del parámetro es directamente proporcional a la homogeneidad en la distribución de los microorganismos en el alimento. La P_{inf} se determinará entonces mediante la siguiente relación:

$$P_{exp}(CV_{ing} | r, p_m) = 1 - \left(1 + p_m \frac{CV_{ing}}{r}\right)^{-r} \quad (4)$$

Heterogeneidad de la interacción patógeno-hospedador

La heterogeneidad en el parámetro p_m (probabilidad de supervivencia del patógeno en el interior del hospedador) viene determinada por una distribución tipo Beta [$g(p_m | \alpha, \beta)$]. La relación final entre la P_{inf} y la dosis ingerida, considerando las asunciones previamente definidas queda determinada de la siguiente forma:

$$P_{inf} = (1 - {}_2F_1(\alpha, r, \alpha + \beta, -CV_{ing}/r)) \quad (5)$$

donde se refleja la probabilidad de infección a través de una función hipergeométrica (${}_2F_1$) con parámetros α y β (Teunis et al., 2008).

Para el cálculo de P_{inf} , se partió de un conjunto de 5.000 datos, cedidos por los autores del estudio y obtenidos mediante simulación con redes bayesianas, referentes a los parámetros α y β del modelo. A partir de diferentes niveles de dosis ($1-10^8$ ufc/ración) se calculó el percentil 50 (mediana) de la P_{inf} (Tabla 5).

Tabla 5. Percentil 50 de las probabilidades de infección (P_{inf}) estimadas a partir de los datos del modelo de Teunis et al. (2010) para niveles de dosis entre 1-10⁸ ufc/ración de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en los sub-grupos de población susceptible y no susceptible

Dosis (ufc)	<i>S. Enteritidis</i>		<i>S. Typhimurium</i>	
	P_{inf} susceptible	P_{inf} no susceptible	P_{inf} susceptible	P_{inf} no susceptible
1	0,836	0,787	0,769	0,662
10	0,891	0,808	0,809	0,720
50	0,899	0,830	0,829	0,737
10 ²	0,902	0,834	0,834	0,741
10 ³	0,910	0,840	0,845	0,788
10 ⁴	0,913	0,845	0,855	0,797
10 ⁵	0,914	0,850	0,860	0,803
10 ⁶	0,917	0,855	0,863	0,812
10 ⁷	0,918	0,857	0,865	0,821
10 ⁸	0,923	0,862	0,871	0,829

De la Tabla 5 se desprende la alta capacidad infectiva de *Salmonella* ya que dosis bajas (<10² ufc/ración) producen una P_{inf} superior en todos los casos a 0,741. La tasa de infección es mayor en *S. Enteritidis*, y a su vez, existen diferencias entre individuos inmunosusceptibles e inmunocompetentes.

Modelos dosis-respuesta de *Listeria monocytogenes*

No hay datos relativos a la relación entre dosis y respuesta obtenidos en estudios con voluntarios expuestos a *L. monocytogenes*, ni tampoco en estudios realizados con un patógeno sustitutivo. Por consiguiente, se han desarrollado y evaluado relaciones dosis-respuesta basándose en consultas a expertos, datos epidemiológicos, estudios en animales, o combinaciones de estas fuentes. Todos los modelos se basan en el supuesto de que cada célula microbiana actúa de forma independiente y que una sola célula bacteriana es capaz de provocar la enfermedad. El modelo utilizado se basó en la evaluación de riesgos de *L. monocytogenes* desarrollada por la FAO/WHO (2004). El modelo comprende un parámetro, r , que es la probabilidad de que una única célula ocasione listeriosis invasiva. Este parámetro se estimó por medio del emparejamiento de las pautas de consumo (exposición) de la población con datos epidemiológicos de numerosos casos de listeriosis invasiva en la población. El valor estimado del parámetro r se utilizó a continuación para calcular, mediante el modelo exponencial, riesgos específicos en función del número de células de *L. monocytogenes* ingeridas a través del consumo de derivados cárnicos. Este tipo de modelo se ha aplicado satisfactoriamente en numerosos estudios de ER (Buchanan et al., 1997) (Notermans et al., 1998) (Lindqvist y Westö, 2000) (FDA, 2003). El modelo aplicado en el presente informe considera una probabilidad de enfermedad por célula de *L. monocytogenes* ingerida de $5,85 \times 10^{-14}$ y $5,34 \times 10^{-12}$ para la población no susceptible y susceptible, respectivamente.

La forma general del modelo exponencial se muestra a continuación:

$$P_{enf} = 1 - e^{-r \cdot x \cdot D} \quad (6)$$

donde P_{enf} = probabilidad de enfermar.

D = dosis ingerida (número de células ingeridas).

r = probabilidad de enfermar después de la ingestión de una sola célula de *L. monocytogenes*.

Aunque existen casos documentados de listeriosis donde la dosis infectiva estuvo próxima a 100 ufc, su ocurrencia es poco frecuente, y generalmente, la dosis causante de enfermedad suele ser más elevada (>8 log ufc/ración) (Pérez-Rodríguez et al., 2007). La elevada dosis infectiva del patógeno es consecuencia del carácter oportunista de la infección (Rodríguez Ferri, 1992). Sin embargo, estos valores, aun siendo elevados, son posibles como consecuencia de la capacidad del patógeno para crecer a temperaturas de refrigeración.

Caracterización del riesgo

La caracterización del riesgo es un "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 o potenciales para la salud de una población dada, sobre la base de la identificación del peligro, la caracterización del mismo y la evaluación de la exposición" (CAC, 1999). Como se ha descrito anteriormente en la evaluación de la exposición, se asumió que la exposición al patógeno es igual en ambos colectivos (bares y restaurantes (BR); geriátricos, guarderías, colegios y hospitales (GGCH)).

Con el fin de considerar la incertidumbre en el número de personas pertenecientes a cada colectivo que resultarían enfermas como consecuencia de una exposición a *Salmonella* y *L. monocytogenes*, se utilizó la distribución de probabilidad binomial.

En el caso del colectivo perteneciente a GGCH se consideró inicialmente que el 100% de la población es susceptible, mientras que en BR, los porcentajes de población susceptible fueron del 29,4% para *Salmonella* y del 18,2% para *L. monocytogenes*, respectivamente. Estos porcentajes correspondieron a los colectivos de población de mayor riesgo asociado a cada tipo de microorganismo. En el caso de *Salmonella*, fueron los niños de <12 años y personas ancianas de >65 años; y en el caso de *L. monocytogenes*, se correspondió con mujeres gestantes e individuos ancianos (>65 años).

Salmonella

Una vez calculada la mediana de la P_{inf} para los distintos niveles de dosis, se realizó un escenario para estimar el número de individuos que resultarían enfermos como consecuencia de la ingestión de células de *Salmonella* a través de preparados cárnicos contaminados.

Se asumieron dos grupos poblacionales para BR y para GGCH de 100 personas cada uno. La distribución binomial permite calcular la probabilidad de que ocurra un suceso, en este caso, la probabilidad de encontrar 0, 1, 2... 1.000 personas enfermas en cada uno de los colectivos considerados.

La ecuación de la función masa de la distribución binomial es la siguiente:

$$P_x = \binom{n}{x} (q^{n-x} p^x) = \left(\frac{n!}{x! (n-x)!} \right) q^{(n-x)} p^x \quad (7)$$

donde n correspondería al número de individuos expuestos (1.000), $P_{(x)}$ la probabilidad de enfermar,

es decir, de encontrar x individuos infectados que enfermen, y q es la probabilidad de encontrar x individuos infectados que no enfermen. La media de la distribución binomial es igual a $n \times p$, mientras que la varianza es igual a $n \times p \times q$. La distribución binomial asume que (i) el número de individuos (n) es predeterminado, (ii) existe independencia entre los mismos, (iii) el individuo puede estar enfermo o sano, y (iv) se considera la misma probabilidad de que un individuo aleatorio dentro de una población pueda enfermar.

Por tanto, en el caso que nos ocupa, $n = 1.000$ y $p = P_{inf} \times P_{enf} | inf$. El valor de p de la distribución fue el resultado de multiplicar la P_{inf} (mediana calculada en la fase de caracterización del peligro) por la probabilidad de enfermar una vez infectado ($P_{enf} | inf$). Se partió del supuesto de que $P_{enf} | inf$ es igual a 0,05 para la población sana y 0,1 para la población susceptible (Buchanan et al., 2000).

En el caso del colectivo perteneciente a GGCH se consideró inicialmente que el 100% de la población es susceptible, mientras que en bares y restaurantes (BR), el porcentaje de población susceptible fue del 29,4%.

A partir de esta información, se procedió a calcular de forma probabilística el número de enfermos. Se empleó el método de simulación de MonteCarlo (10.000 iteraciones) mediante el software *ModelRisk* v3.0 (Vose Consulting, Bélgica). Los resultados obtenidos para los colectivos de BR y GGCH para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* se muestran en las Figuras 3 y 4 para diferentes niveles de dosis.

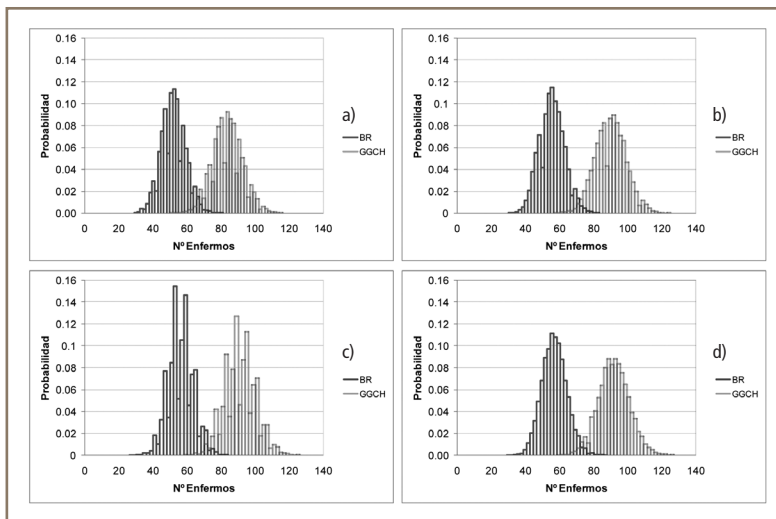


Figura 3. Estimación del número de enfermos por *S. Enteritidis* bajo distintos niveles de dosis ingerida (a) 1 ufc; b) 50 ufc; c) 10^3 ufc; d) 10^5 ufc/ración) en las poblaciones pertenecientes a bares y restaurantes (BR) y a hospitales, geriátricos, colegios y guarderías (GGCH).

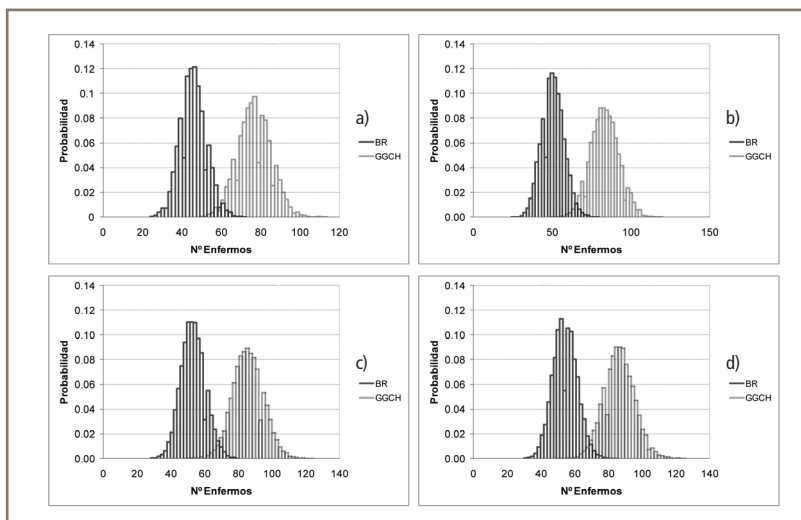


Figura 4. Estimación del número de enfermos por *S. Typhimurium* bajo distintos niveles de dosis ingerida (a) 1 ufc; b) 50 ufc; c) 10^3 ufc; d) 10^6 ufc/ración en las poblaciones pertenecientes a bares y restaurantes (BR) y a hospitales, geriátricos, colegios y guarderías (GGCH).

Los estadísticos media, valor mínimo, valor máximo y percentil 95 de las distribuciones representadas para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, aparecen en las Tablas 6 y 7, respectivamente.

Dosis (ufc/ración)	Establecimiento	Número de enfermos			
		Media	Mínimo	Percentil 95	Máximo
1	BR	52,07	29	64	83
	GGCH	83,70	50	98	116
10	BR	54,55	29	67	85
	GGCH	88,99	56	104	125
50	BR	55,53	30	68	85
	GGCH	90,01	57	105	125
10^2	BR	55,81	31	68	85
	GGCH	90,17	59	105	125
10^3	BR	56,19	32	69	86
	GGCH	91,06	59	106	126
10^6	BR	56,94	33	69	87
	GGCH	91,70	60	107	127
10^8	BR	57,00	35	69	87
	GGCH	92,00	59	108	128

Tabla 7. Media, valor mínimo, valor máximo y percentil 95 de las distribuciones finales del número de enfermos por *S. Typhimurium* estimado para los colectivos de BR y GGCH asumiendo dosis ingeridas de 1, 10, 50, 10², 10³, 10⁶ y 10⁸ ufc/ración

Dosis (ufc/ración)	Establecimiento	Número de enfermos			
		Media	Mínimo	Percentil 95	Máximo
1	BR	45,74	24	57	71
	GGCH	76,83	50	91	114
10	BR	49,02	26	60	79
	GGCH	80,93	51	95	114
50	BR	50,44	16	62	80
	GGCH	83,31	52	98	120
10 ²	BR	52,41	28	64	80
	GGCH	84,53	52	99	121
10 ³	BR	53,05	28	65	81
	GGCH	85,63	52	100	125
10 ⁶	BR	54,13	30	66	84
	GGCH	86,36	52	101	126
10 ⁸	BR	55,00	31	67	82
	GGCH	88,00	55	102	126

Los resultados del modelo dosis-respuesta mostraron que la probabilidad de infección por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* no se incrementa significativamente con un aumento de la dosis ingerida. Este hecho puede deberse en parte a la alta variabilidad de la dosis infectiva de los serotipos de *Salmonella* hallada en distintos estudios. Blaser y Newman (1982) detectaron dosis infectivas en humanos de entre 10⁵ y 10¹⁰ ufc. En cambio, para sectores de población susceptibles, se han encontrado dosis de entre 10¹ y 10³ ufc (Vought y Tatini, 1998). En el caso que se nos presenta, se constató el alto grado de infectividad de los serotipos de *Salmonella* estudiados, ya que bajos niveles de dosis pueden potencialmente causar enfermedad, siendo *S. Enteritidis* el patógeno que provocaría una mayor incidencia de individuos enfermos. Sin embargo, las estimaciones del riesgo de salmonelosis están supeditadas al tipo de modelo dosis-respuesta utilizado. En el presente informe, se consideró el modelo de Teunis et al. (2010) como el más apropiado ya que diferencia dos grupos de población (susceptible y no susceptible), y está construido en base a información epidemiológica de brotes causados por alimentos contaminados.

Por otro lado, los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre los colectivos estudiados, ya que el valor estimado del número de enfermos en GGCH fue mayor en un 61% y 64% para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, respectivamente en comparación con BR.

La alta infectividad de *Salmonella*, junto con la mayor susceptibilidad asociada al colectivo de GGCH, hace que dosis de *S. Enteritidis* de tan sólo 1 ufc, puedan dar lugar a la aparición de 50 personas enfermas/1.000 personas expuestas en GGCH. Asimismo, se puede constatar que esta estimación

(con una dosis de 1 ufc/ración), sigue siendo superior a la obtenida en BR con dosis de hasta 10^6 ufc/ración (33 enfermos/1.000 personas expuestas). Es decir, en el supuesto de que un producto cárnico contaminado, aun con bajas concentraciones de *Salmonella*, se consumiera en GGCH, producirá en todos los casos un mayor número de personas enfermas que si el mismo producto se consumiera en BR.

Por tanto, a la luz de los resultados obtenidos, se hace necesaria una completa inactivación de *Salmonella* en los preparados cárnicos previa a su consumo (Giovannini et al., 2004). En base a diversos estudios realizados en preparados cárnicos, como salchichas frescas (Mürmann et al., 2011), o en otros productos cárnicos como pollo cocinado (Oscar, 2004), se ha constatado que un ineficiente tratamiento térmico puede conllevar un aumento del riesgo de salmonelosis si la materia prima está contaminada.

La efectividad del tratamiento dependerá a su vez de la contaminación inicial de *Salmonella* en el preparado cárnico fresco. Por ello, se debe llevar a cabo un control estricto de la materia prima por parte de la autoridad sanitaria competente (Mürmann et al., 2011). El nivel de contaminación será mayor cuando el alimento se almacene a temperaturas de abuso, o durante un largo tiempo, o bien cuando las condiciones higiénico-sanitarias de los proveedores son deficientes. Cabe señalar que en el caso de que un preparado cárnico presente un alto nivel de contaminación, necesitará un tratamiento térmico más intenso para garantizar su seguridad microbiológica. A este respecto, el tipo de tratamiento posee una influencia sobre la inactivación de *Salmonella* en preparados cárnicos. Gonzales-Barrón et al. (2010) realizaron una evaluación del riesgo de *S. Typhimurium* asociada al consumo de salchichas de cerdo en Irlanda. Los resultados del estudio indicaron que, de entre los lotes contaminados de salchichas, aquéllas cocinadas a la parrilla presentaron un mayor riesgo de salmonelosis que las salchichas sometidas a fritura, debido fundamentalmente a las diferencias de temperatura y tiempo de cada uno de los tratamientos evaluados.

En los establecimientos de restauración colectiva, además del tratamiento térmico, un adecuado proceso de descongelación, y un mantenimiento en caliente del producto una vez cocinado constituyen medidas alternativas para reducir el riesgo de infección por *Salmonella* (Bemrah et al., 2003). Paralelamente, se hace necesaria una adecuada formación del personal implicado en la manipulación de alimentos así como una mayor información en el etiquetado de los preparados cárnicos incluyendo las condiciones de tratamiento y manipulación que se deben llevar a cabo para garantizar la seguridad microbiológica de cara al consumidor (Oscar, 2004).

Listeria monocytogenes

En el caso de *L. monocytogenes*, el número de casos de listeriosis se estimó siguiendo la misma metodología aplicada en el estudio de *Salmonella*, aunque con aplicación del modelo dosis-respuesta descrito anteriormente para *L. monocytogenes* (ecuación 6).

Los resultados indicaron que dosis por debajo de 10^4 ufc/ración no produjeron casos de listeriosis en los dos colectivos estudiados (GGCH y BR) (Tabla 8). Sin embargo, en establecimientos con colectivos considerados de mayor riesgo (GGCH), niveles superiores a este valor estuvieron asociados a la aparición de la enfermedad. Se observa para GGCH, una incidencia máxima de un enfermo/1.000 personas expuestas para una dosis de 10^5 ufc/ración, y cuatro enfermos para la dosis máxima de 10^8 ufc/ración. Por el contrario, en BR no se obtuvieron casos de listeriosis para todas las dosis consideradas, indicando

que el nivel de riesgo en este tipo de establecimientos fue notablemente menor que en GGCH, donde existe una mayoría de población susceptible.

Tabla 8. Media, valor mínimo, valor máximo y percentil 95 de las distribuciones finales del número de enfermos por *Listeria monocytogenes* estimado para los colectivos de BR y GGCH asumiendo dosis ingeridas de $1-10^8$ ufc/ración

Dosis (ufc/ración)	Establecimiento	Número de enfermos			
		Media	Mínimo	Percentil 95	Máximo
$1-10^4$	BR	0	0	0	0
	GGCH	0	0	0	0
10^5	BR	0	0	0	0
	GGCH	0,001	0	0	1
10^6	BR	0	0	0	0
	GGCH	0,005	0	0	1
10^7	BR	0	0	0	0
	GGCH	0,059	0	1	2
10^8	BR	0	0	0	0
	GGCH	0,585	0	2	4

Como se ha señalado anteriormente, la listeriosis presenta una importante tasa de mortalidad. El estudio realizado por FDA (2003) estimó la tasa de mortalidad para cada uno de los grupos susceptibles a *L. monocytogenes*. Aplicando esta tasa a nuestros resultados, se estimó que un nivel de 10^8 ufc/ración podría conducir a la muerte a uno de los cuatro enfermos estimados en GGCH. Este dato pone de relevancia la gran susceptibilidad de este tipo de colectivos, al igual que las consecuencias fatales que se podrían derivar de una exposición a una dosis elevada del patógeno.

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran la existencia de diferencias entre los colectivos de población estudiados en cuanto a la magnitud de la respuesta morbosa ante la ingestión de idénticas dosis de microorganismos patógenos. El número de enfermos estimados es mayor en el caso del colectivo de geriátricos, guarderías, colegios y hospitales (GGCH) en comparación con el de bares y restaurantes (BR), tanto para los serotipos de *Salmonella* estudiados como para *Listeria monocytogenes*. Debe tenerse en cuenta que los datos estimados en la presente Evaluación del Riesgo son a igualdad de tamaños de la población y a igualdad de dosis en ambos colectivos (GGCH y BR). Así, en relación al tamaño de la población, si se asumiera un mayor número de personas en GGCH que en BR, se acrecentarían aún más las diferencias en el número de enfermos entre ambos colectivos.

Por otro lado, la dosis influye de forma distinta según se trate de *Salmonella* o de *Listeria monocytogenes*. Así, distintas dosis de *Salmonella* en GGCH o en BR no se traducirían de forma notable en un mayor o menor número de casos en ambos colectivos, aunque no es así para el caso de *Listeria*

monocytogenes, en el que sólo dosis superiores a 10^4 ufc/ración producirían un aumento en el número de enfermos en el colectivo de GGCH donde la totalidad de la población ha sido considerada como susceptible.

Referencias

- AESAN (2009). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne in Humans, Foodstuffs, Animals and Feedingstuffs, including information on Foodborne Outbreaks, antimicrobial resistance in zoonotic agents and some pathogenic microbiological agents. Spain 2009. Disponible en: http://www.aesan.msp.es/AESAN/docs/docs/control_oficial/planes_nacionales_especificos/Informe_fuentes_2009_ESPANA.pdf [acceso: 27-7-11].
- Aureli, P., Fiorucci, G.C., Caroli, D., Marchiaro, B., Novara, O., Leone, L. y Salmoso, S. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New England Journal of Medicine*, 342, pp: 1236-1241.
- Bemrah, N., Bergis, H., Colmin, C., Beaufort, A., Millemann, Y., Dufour, B., Benet, J.J., Cerf, O. y Sanaa, M. (2003). Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of a turkey product in collective catering establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 80, pp: 17-30.
- Blaser, M.J. y Newman, L.S. (1982). A review of human salmonellosis I: Infective dose. *Reviews of Infectious Diseases*, 4, pp: 1096-1106.
- Bollaerts, K., Aerts, M., Faes, C., Grijspeerdt, K., Dewulf, J. y Mintiens, K. (2008). Human salmonellosis: estimation of dose-illness from outbreak data. *Risk Analysis: an official publication of the Society for Risk Analysis*, 28, pp: 427-440.
- Buchanan, R.L., Damert, W.G., Whiting, R.C. y van Schothorst, M. (1997). Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. *Journal of Food Protection*, 60, pp: 918-922.
- Buchanan, R.L. Smith, J.L. y Long, W. (2000). Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization. *International Journal of Food Microbiology*, 58, pp: 159-172.
- CAC (1999). *Codex Alimentarius Commission*. Establishment of sampling plans for microbiologically safety criteria for foods in international trade including recommendations for control of *Listeria monocytogenes*. Document prepared by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods for the Codex Committee on Food Hygiene, 31st session 29 November-4 December 25 1999, *Codex Alimentarius Commission*, Washington, D.C., E.U.
- CAST (1994). Council for Agricultural Science and Technology. Foodborne pathogens: risks and consequences. *Task Force Report*, 122, pp: 25-26.
- Coleman, M.E. y Marks, H.M. (1998). Topics in dose-response modeling. *Journal of Food Protection*, 61, pp: 1550-1559.
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M. y Swaminathan, B. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New England Journal of Medicine*, 336, pp: 100-105.
- EFSA y ECDC (2011). European Food Safety Authority y European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. doi:10.2903/j.efsa.2011.2090.
- FAO/WHO (1995). Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Application of risk analysis to food standards issues. Disponible en: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/march1995.pdf> [acceso: 6-7-11].
- FAO/WHO (2004). Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Technical Report. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_listeria/en/index.html [acceso: 6-7-11].

- Fazil, A.M. (1996). A quantitative risk assessment model for *Salmonella*. Thesis. Drexel University, Philadelphia.
- FDA (2003). Food and Drug Administration. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/RiskAssessmentSafetyAssessment/UCM197330.pdf> [acceso: 14-3-2011].
- FDA/FSIS (1998). Food and Drug Administration/Food Safety and Inspection Service. *Salmonella* Enteritidis risk assessment. Shell eggs and egg products. Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/ophs/risk/> [acceso: 6-7-11].
- Gerba, C.P., Rose, J.B. y Haas, C.N. (1996). Sensitive populations: who is at greatest risk? *International Journal of Food Microbiology*, 30, pp: 113-123.
- Giovannini, A., Prencipe, V., Conte, A., Marino, L., Petrini, A., Pomilio, F., Rizzi, V. y Migliorati, G. (2004). Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. *Food Control*, 15, pp: 139-144.
- Gonzales-Barrón, U., Redmond, G. y Butler, F. (2010). A risk characterization model of *Salmonella* Typhimurium in Irish fresh pork sausages. *Food Research International* (in press).
- INE (2011). Instituto Nacional de Estadística. Población española por edad a 1 de enero de 2011. Disponible en: www.ine.es [acceso 25-3-11].
- Latimer, H.K., Jaykus, L.A., Morales, R.A., Cowen, P. y Crawford-Brown, D. (2001). A weighted composite dose-response model for human salmonellosis. *Risk Analysis*, 21, pp: 295-305.
- Lindqvist, R. y Westöö, A. (2000). Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 58, pp: 181-196.
- McLauchlin, J. (1997). The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: A public health perspective. *Reviews in Medical Microbiology*, 8, pp: 1-14.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J. y Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92, pp: 15-33.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCraig, L.F., Bresee, S., Shapiro, C., Griffin, P.M. y Tauxe, R.V. (1999). *Food-related illness and death in the United States*. *Emerging Infectious Diseases*, 5, pp: 607-625.
- Medema, G.J., Teunis, P.M.F., Havelaar, A.H. y Haas, C.N. (1996). Assessment of the dose-response relationship of *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology*, 30, pp: 101-111.
- Mürmann, L., Corbellini, L.G., Ávila Collor, A. y Cardoso, M. (2011). Quantitative risk assessment for human Salmonellosis through the consumption of pork sausage in Porto Alegre, Brazil. *Journal of Food Protection*, 74, pp: 553-558.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P. y Chackraborty, T. (1998). Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 61, pp: 244-248.
- Oscar, T. (2004). A quantitative risk assessment model of *Salmonella* and whole chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 93, pp: 231-247.
- Pérez-Rodríguez, F., van Asselt, E.D., García-Gimeno, R.M., Zurera, G. y Zwietering, M.H. (2007). Extracting additional risk managers information from a risk assessment of *Listeria monocytogenes* in deli meats. *Journal of Food Protection*, 70, pp: 1137-1152.
- Real Decreto 1376/2003, de 7 de noviembre, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor. BOE 273 de 14 de noviembre de 2003, pp: 40094-40101.
- Real Decreto 728/2011, de 20 de mayo, por el que se modifica el Real Decreto 1376/2003, de 7 de noviembre, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor. BOE 131, de 2 de junio de 2011, pp: 54461-54462.

- Rocourt, J. (1996). Risk factors for listeriosis. *Food Control*, 7, pp: 192-202.
- Rocourt, J. y Bille, J. (1997). Foodborne listeriosis. *World Health Stat Q*, 50, pp: 67-73.
- Rodríguez Ferri, E.F. (1992). Conferencia de Consenso: *Listeria* en alimentos. Ministerio de Sanidad y Consumo. León (España).
- Rose, J.B., Haas, C.N. y Gerba, C.P. (1995). Linking microbiological criteria for foods with quantitative risk assessment. *Journal of Food Safety*, 15, pp: 121-132.
- Smith, J.L. (1998). Long term consequences of foodborne toxoplasmosis: effects on the unborn, the immunocompromised, the elderly and the immunocompetent. *Journal of Food Protection*, 60, pp: 1595-1611.
- Teunis, P.F.M., Nagelkerke, N.J.D. y Haas, C.N. (1999). Dose response models for infectious gastroenteritis. *Risk Analysis*, 19, pp: 1251-1260.
- Teunis, P.M.F., Ogden, I.D. y Strachan, N.J.C. (2008). Hierarchical dose response of *E. coli* O157:H7 from human outbreaks incorporating heterogeneity in exposure. *Epidemiology and Infection*, 136, pp: 761-770.
- Teunis, P.M.F., Kasuga, F., Fazil, A., Ogden, I.D., Rotariu, O. y Strachan, N.J.C. (2010). Dose-response modeling of *Salmonella* using outbreak data. *International Journal of Food Microbiology*, 144, pp: 243-249.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. y Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, pp: 584-640.
- Voetsch, A.C., Van Gilder, T.J., Angulo, F.J., Farley, M.M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P.R., Deneen, V.C. y Tauxe, R.V. (2004). FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 38, pp: S127-S134.
- Vought, K.J. y Tatini, S.R. (1998). The application of quantitative risk assessment to microbial food safety. *Journal of Food Protection*, 61, pp: 640-648.
- WHO (2003). World Health Organization. Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/y4392e/y4392e00.htm> [acceso: 6-7-11].

Colaboración

Cooperación científica con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)

Cristina Alonso Andicoberry, *Unidad de Coordinación Científica. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).*

Resumen

La cooperación científica entre la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y los Estados miembros es una parte básica del propio Reglamento fundacional de EFSA y una prioridad de su Estrategia para la Cooperación y Establecimiento de Redes y su Plan Estratégico 2009-2013. La colaboración estrecha con los Estados miembros es fundamental para asegurar que la protección de los consumidores y las políticas sanitarias se basan firmemente en las mejores evidencias científicas disponibles y su objetivo último es aprovechar la excelencia científica existente en los Estados miembros.

La cooperación científica entre EFSA y los Estados miembros se basa en cinco puntos: el Comité Consultivo, los Puntos Focales, las Redes de Expertos de EFSA, la Lista de artículo 36 y la Base de Datos de Expertos. En resumen, la cooperación científica tiene lugar a través de las autoridades nacionales competentes, organizaciones científicas y expertos y científicos individuales.

Palabras clave

Cooperación Científica, EFSA, Lista de artículo 36, Base de Datos de Expertos, Plataforma de Intercambio de Información.

Scientific Cooperation with the European Food Safety Authority.

Abstract

Scientific Cooperation between the European Food Safety Authority (EFSA) and the Member States is a basic part of EFSA's foundational Regulation and a priority in its Strategy for Cooperation and Networking and its Strategic Working Plan 2009-2013. Close cooperation with Member States is

essential to ensure that consumer's protection and health policies are firmly based on the best scientific evidence available. Its ultimate objective is to unify all the scientific excellence in Europe.

Scientific cooperation between EFSA and the Member States is based on five items: the Advisory Forum, the Focal Points, EFSA's Scientific Networks, Article 36 List and Expert DataBase. In summary, scientific cooperation occurs through the national competent authorities, scientific organizations and individual experts.

Key words

Scientific Cooperation, EFSA, Article 36 List, Expert Data Base, Information Exchange Platform.

Introducción

Dentro de las diferentes agencias de la Unión Europea (UE), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es una de las denominadas agencias comunitarias y como tal es un organismo del Derecho público europeo con personalidad jurídica propia que lleva a cabo tareas muy concretas de carácter técnico, científico o de gestión y está financiada con los presupuestos de la Unión. Sin embargo, las agencias comunitarias actúan, dentro del marco de sus competencias, de manera independiente de las instituciones europeas (Comisión Europea, Parlamento Europeo y Estados miembros).

EFSA se creó en el año 2002 mediante el Reglamento (CE) Nº 178/2002 (UE, 2002), tras una serie de crisis alimentarias acaecidas durante el final de la década de los 90. Su labor fundamental es la asesoría científica y técnica y la comunicación de riesgos existentes y emergentes, en materia de seguridad de alimentos y piensos, a lo largo de toda la cadena alimentaria. Es decir, sus competencias se extienden a los alimentos, los piensos, la sanidad y la protección vegetal y la sanidad y el bienestar animal.

La creación de EFSA formó parte de un extenso programa de la UE para mejorar la seguridad alimentaria en Europa, asegurar un elevado nivel de protección del consumidor y restablecer y mantener la confianza de los consumidores en los productos alimenticios europeos.

En última instancia, EFSA es el evaluador del riesgo de la UE y elabora opiniones y consejos científicos que proporcionan una base sólida para que los gestores del riesgo, a su vez, elaboren políticas y normativas adecuadas y para apoyar a las instituciones europeas (Comisión, Parlamento y Consejo) y a los Estados miembros a la hora de tomar decisiones oportunas y eficaces.

EFSA actúa en estrecha colaboración con las autoridades nacionales de los Estados miembros competentes en materia de seguridad alimentaria y de los piensos y mantiene una comunicación abierta con todas las demás partes implicadas. La cooperación científica entre la Autoridad y los Estados miembros es una parte básica del propio Reglamento fundacional de EFSA (UE, 2002) y, por tanto, una prioridad de su Estrategia para la Cooperación y Establecimiento de Redes (EFSA, 2006) y su Plan Estratégico 2009-2013 (EFSA, 2008b). Para EFSA, la cooperación estrecha con los Estados miembros es fundamental para asegurar que la protección de los consumidores y las políticas sanitarias se basan firmemente en las mejores evidencias científicas disponibles (EFSA, 2011d). El objetivo último de esta cooperación es aprovechar la excelencia científica existente en los Estados miembros.

A nivel nacional, de acuerdo con el artículo 4.7 de la Ley 11/2001, por la que se crea la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), la AESAN es responsable de la interlocución con la Autoridad Alimentaria Europea. Ello supone la doble misión de distribución de la información procedente de EFSA y de transmisión de puntos de vista y criterios españoles en los diferentes aspectos relacionados con la seguridad alimentaria.

EFSA dispone de cinco pilares en la cooperación científica con los Estados miembros: el Comité Consultivo (*Advisory Forum*, AF), los Puntos Focales (PF), las Redes de Expertos de EFSA, la Lista de artículo 36 y la Base de Datos de Expertos (EBD, en sus siglas en inglés) (EFSA, 2011d). En resumen, la cooperación científica tiene lugar a través de las autoridades nacionales competentes (AF y PF), organizaciones científicas (Redes EFSA y Lista de artículo 36) y expertos y científicos individuales (EDB y miembros de Paneles científicos, Grupos de Trabajo y Comité Científico).

De manera paralela, en su presupuesto anual, EFSA tiene previstas ayudas económicas para algunas

actividades de cooperación científica, por lo que las diferentes estrategias de cooperación podrían clasificarse igualmente como financiadas y no financiadas.

En este trabajo se describen las herramientas empleadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria para asegurar la cooperación científica con los Estados miembros.

Cooperación científica a nivel nacional

La cooperación científica entre EFSA y las autoridades nacionales competentes en materia de alimentos, piensos, sanidad y protección vegetal y sanidad y bienestar animal es la clave que asegura que la Autoridad puede proporcionar a los gestores del riesgo las mejores opiniones científicas, pues en colaboración con los Estados miembros se establecen las prioridades científicas y las herramientas necesarias para llevar el trabajo a cabo.

En la cooperación científica a nivel nacional, los participantes en las actividades de cooperación representan a su Estado miembro.

1. Comité Consultivo

El Comité Consultivo (*Advisory Forum, AF*) conecta a la Autoridad con las autoridades nacionales competentes en materia de seguridad alimentaria de los Estados miembros, Islandia y Noruega. En sus reuniones participan, además, como observadores, representantes de Suiza y de los Estados candidatos a la UE.

El AF tiene un papel estratégico, pues sus miembros aconsejan a la Dirección Ejecutiva de EFSA sobre temas científicos, planes y prioridades de trabajo y, además, ayudan a identificar de manera temprana los riesgos emergentes.

EFSA, con la ayuda del AF, puede aunar fuerzas con los Estados miembros para identificar los temas de interés en Europa en evaluación y comunicación del riesgo. Igualmente, el AF tiene un papel fundamental a la hora de implementar adecuadamente la Estrategia para la Cooperación y Establecimiento de Redes (EFSA, 2006), al proporcionar el marco adecuado para desarrollar evaluaciones del riesgo de calidad basadas en pilares científicos sólidos y en metodologías armonizadas.

Una de las tareas principales del AF es crear vínculos entre las instituciones nacionales, en cada Estado miembro, que trabajan dentro de las competencias de EFSA. El objetivo es maximizar la participación y el intercambio de información científica, la colaboración para evitar opiniones divergentes, la promoción de la coherencia en la comunicación de los riesgos, la identificación temprana de los riesgos emergentes y la coordinación para evitar la duplicidad en el trabajo.

En España, la representación nacional en el AF la ejerce la Presidencia de la AESAN como miembro titular. Además, existen dos sustitutos (Dirección Ejecutiva y Vocalía Asesora de la Dirección Ejecutiva).

Grupos de Trabajo ESCO

Los Grupos de Trabajo ESCO (*EFSA Scientific Cooperation*) se establecieron en base a las recomendaciones del Consejo de Dirección de la Autoridad (EFSA, 2006). Son grupos creados siguiendo las directrices tanto del AF como del Comité Científico de EFSA.

Estos grupos se centran en temas específicos de seguridad alimentaria y de los piensos identificados como de interés tanto para los Estados miembros como para EFSA. Hasta este momento, se han esta-

blecido siete grupos de trabajo para siete proyectos ESCO que han versado sobre temas muy diversos: evaluación de la seguridad de los preparados de plantas, abordaje de los riesgos emergentes, establecimiento de una base de datos de expertos, ácido fólico, establecimiento de estrategias armonizadas de evaluación del riesgo, isoflavonas y materiales en contacto con los alimentos distintos de los plásticos.

Los participantes en estos grupos de trabajo son expertos nacionales propuestos por las autoridades competentes de los Estados miembros a través del AF. También participan miembros de los Paneles científicos, del Comité Científico y personal científico de EFSA. La supervisión de estos proyectos conjuntos la realiza el denominado Grupo Director de Cooperación (*Steering Group on Cooperation, SGC*), formado por miembros del Comité Científico de EFSA y del AF.

Los informes resultantes de los proyectos ESCO se envían a la Dirección Ejecutiva de EFSA, quien decidirá la conveniencia de solicitar a los Paneles científicos y al Comité Científico más información al respecto.

Debido a la existencia de numerosas redes de trabajo, actualmente EFSA está considerando reducir el número de proyectos ESCO y reconsiderar el mandato del Grupo Director de Cooperación.

2. Puntos Focales

La red de Puntos Focales se estableció en el año 2007. Su función principal es la de ayudar y apoyar al AF en el establecimiento y fortalecimiento de redes a nivel nacional; es decir, dentro de cada Estado miembro y dar visibilidad a EFSA.

Es una red de cooperación científica cofinanciada. La red se mantiene mediante la firma anual de un convenio de cooperación entre EFSA y la autoridad nacional competente que actúa de representante. En España, la AESAN actúa como Punto Focal de EFSA y como tal se encarga de distribuir la información de interés mediante boletines informativos y la organización de diversas reuniones.

En la actualidad, EFSA ha firmado convenios con todos los Estados miembros, Islandia y Noruega. Forman parte de la red como observadores, Suiza desde el inicio del trabajo de los Puntos Focales y los Países candidatos a la UE desde septiembre de 2009.

Las funciones de los Puntos Focales son variadas, e incluyen el intercambio de información con EFSA y otros Puntos Focales en temas de interés, la recogida de datos de evaluación de riesgo en temas específicos, el mantenimiento de la Plataforma de Intercambio de Información (IEP), la publicidad y el apoyo a EFSA en la entrada de expertos en la Base de Datos y el mantenimiento, ampliación, mejora y fortalecimiento de la Lista de artículo 36.

En última instancia, la red de Puntos Focales tiene como objetivo mejorar y ampliar la visibilidad de EFSA dentro de los Estados miembros. Para ello, los Puntos Focales realizan y organizan actividades dentro de sus respectivos países, como la creación de espacios web específicos, la publicación de convocatorias, petición de datos y otras solicitudes de EFSA y la organización de eventos nacionales a los que se invita a miembros de EFSA o de otros Puntos Focales, entre otras.

En España, el Punto Focal tiene un espacio propio en la página web de AESAN y, además emplea un boletín electrónico para la difusión de la información a sus receptores: Boletín nodoAESAN informa, en el que se publican todas las noticias relativas a EFSA, además de otras de interés para AESAN.

Para poder intercambiar experiencias, recibir información adicional de EFSA y desarrollar aún más sus redes, los Puntos Focales de todos los Estados miembros se reúnen tres veces al año.

3. Redes de Expertos de EFSA

El establecimiento y coordinación de redes de organizaciones nacionales (representadas por expertos) que operan dentro de su campo de actuación es una de las obligaciones de EFSA, tal y como se define en el artículo 23(g) del Reglamento (CE) Nº 178/2002 (UE, 2002). Además, existe una amplia legislación sectorial (por ejemplo, en el área de los organismos modificados genéticamente) que prevé una estrecha colaboración entre la Autoridad y los Estados miembros.

Las normas de establecimiento y operación de estas redes se definen en una Decisión del Consejo de Dirección de EFSA publicada en 2010 (EFSA, 2010b). Según esta Decisión, las redes estarán formadas por representantes de organizaciones científicas de los Estados miembros, generalmente en número de uno por cada país, designados por el AF.

Actualmente, existen diversas redes operativas:

- Grupo de Expertos de Incidencia de Sustancias Químicas (*Expert Group on Chemical Occurrence*).
- Grupo Director de Plaguicidas (*Pesticide Steering Committee*).
- Red de Control de Residuos de Plaguicidas (*Networking Group on Pesticide Monitoring*).
- Grupo de Trabajo de Recogida de Datos de Zoonosis (*Task Force on Zoonoses Data Collection*).
- Grupo de Expertos en Consumo de Alimentos (*Expert Group on Food Consumption*).
- Red Científica de Evaluación de Riesgos de OGM (*Scientific Network for Risk Assessment of GMOs*).
- Red Científica de Evaluación de Riesgos en Sanidad Vegetal (*Scientific Network for Risk Assessment in Plant Health*).
- Red Científica de Evaluación de Riesgos en Sanidad y Bienestar Animal (*Scientific Network for Risk Assessment in Animal Health and Welfare*).
- Red Científica de Evaluación de Riesgos Microbiológicos (*Scientific Network for Microbiological Risk Assessment*).
- Red Científica en BSE/TSE (*Scientific Network on BSE/TSE*).
- Red de Riesgos Emergentes (*Network on Emerging risks*).
- Red Científica de Evaluación de Riesgos en Nanotecnología en Alimentos y Piensos (*Scientific Network for Risk Assessment of Nanotechnologies in Food and Feed*).

En un futuro próximo, se pretende clarificar aún más la actuación de estas redes y documentarla cada año; además, se prevé informar periódicamente al AF sobre los resultados y actividades de cada una de estas redes (EFSA, 2011d).

Financiación del apoyo a EFSA

Dentro de la cooperación científica financiada y cofinanciada, EFSA ofrece las denominadas convocatorias de *grants* y *procurements*.

Las convocatorias de *grants* (*calls for proposals*) están destinadas a las organizaciones de la Lista de artículo 36. La denominada "Lista de artículo 36" tiene su base legal en el artículo 36 del Reglamento 178/2002 (UE, 2002), y más concretamente, en el apartado 2 que indica que:

La Junta Directiva, a propuesta del Director Ejecutivo, elaborará una lista, que se hará pública, de organizaciones competentes nombradas por los Estados miembros, que podrán ayudar a la Autoridad

en su cometido a título individual o colectivo. La Autoridad podrá confiar a estas organizaciones tareas tales como el trabajo preparatorio de los dictámenes científicos, asistencia científica y técnica, la recopilación de datos y la identificación de riesgos emergentes. Algunas de estas tareas podrán optar a ayuda financiera.

En la actualidad, la Lista la componen casi 400 organizaciones, de las cuales, en la actualidad, 22 son españolas (Tabla 1).

Tabla 1. Lista española de organizaciones de artículo 36

1	Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (ACSA)
2	Centro Nacional de Alimentación (CNA-AESAN)
3	Consejo Superior Investigaciones Científicas (CSIC)
4	Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia
5	Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid
6	Fundación Centro de Investigación en Sanidad Animal (CRESA)
7	Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (ELIKA)
8	Grupo de Investigación en Seguridad Alimentaria y Microbiología de Alimentos (DHT03/GR155). Facultad de Veterinaria. Universidad de León
9	Grupo SALUVET. Departamento Patología Animal I (Sanidad Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid
10	Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA)
11	Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INRYTA)
12	Laboratorio Agroalimentario de Cabriils. Generalitat de Cataluña
13	Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Madrid. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
14	Laboratorio Central de Veterinaria de Algete. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
15	Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología. Universidad de las Islas Baleares
16	Laboratorio de Micología Clínica. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid
17	Laboratorio de Referencia de la Unión Europea de Biotoxinas Marinas (EURLMB-AESAN)
18	Laboratorio de Salud Pública de Lugo. Consellería de Sanidade. Xunta de Galicia
19	Laboratorio Regional de Salud Pública. Comunidad de Madrid
20	Servicio de Análisis de Fármacos. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona
21	Universidad Complutense de Madrid
22	Universidad de Córdoba

Fuente: (EFSA, 2011c).

La financiación de las convocatorias de artículo 36 se realiza a través de los denominados *grants* (mediante la firma de convenios). A estas ayudas financieras sólo pueden optar las organizaciones que figuran en la Lista oficial de artículo 36, a diferencia de los denominados *procurements* (mediante la firma de contratos), cuya solicitud está abierta a cualquier organización que cumpla los requisitos establecidos en la convocatoria. Por otro lado, como se puede ver en la Tabla 2, los objetivos y el formato de ambos tipos de convocatorias son diferentes.

	Grants	Procurements
Objeto	Ayudar económicamente a la realización de un trabajo	Comprar un servicio
Propiedad de los datos	Beneficiario de la convocatoria	EFSA
Contribución económica por parte de EFSA	90% del total del presupuesto presentado por el beneficiario	Precio acordado
Tipo de convocatoria	<i>Call for proposal</i>	<i>Call for tender</i>
Forma legal	Convenio	Contrato

De acuerdo con el Reglamento (CE) N° 2230/2004 (UE, 2004), las áreas de trabajo en las que EFSA puede pedir colaboración a las organizaciones de la Lista son tres:

- Recopilación de datos.
- Trabajo preliminar a la elaboración de opiniones científicas.
- Otro tipo de asistencia científica y técnica.

Anualmente, EFSA publica en su página web una previsión de los presupuestos destinados a cada una de estas áreas, con una propuesta de las áreas potenciales en las que se publicarán convocatorias de artículo 36 (*calls for proposals*).

En los presupuestos anuales destinados a *grants* y *procurements* se puede observar una tendencia creciente. Sin embargo, la parte del presupuesto destinado a *grants* apenas ha variado, lo que indica que EFSA destina un mayor esfuerzo económico a los denominados *procurements* (Figura 1).

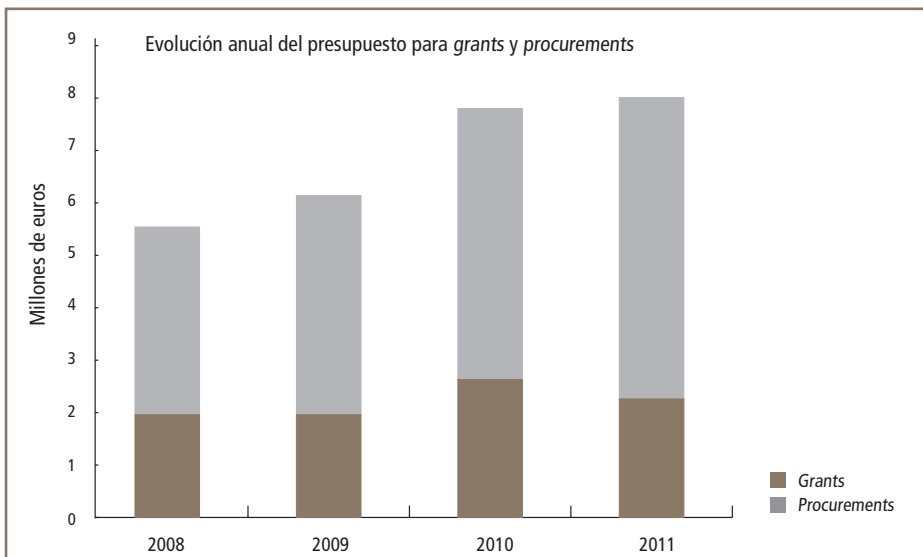


Figura 1. Evolución anual del presupuesto de EFSA destinado a *grants* y *procurements*.

Asimismo, el número de convocatorias anuales de *procurements* es superior al de *grants* (Figura 2).

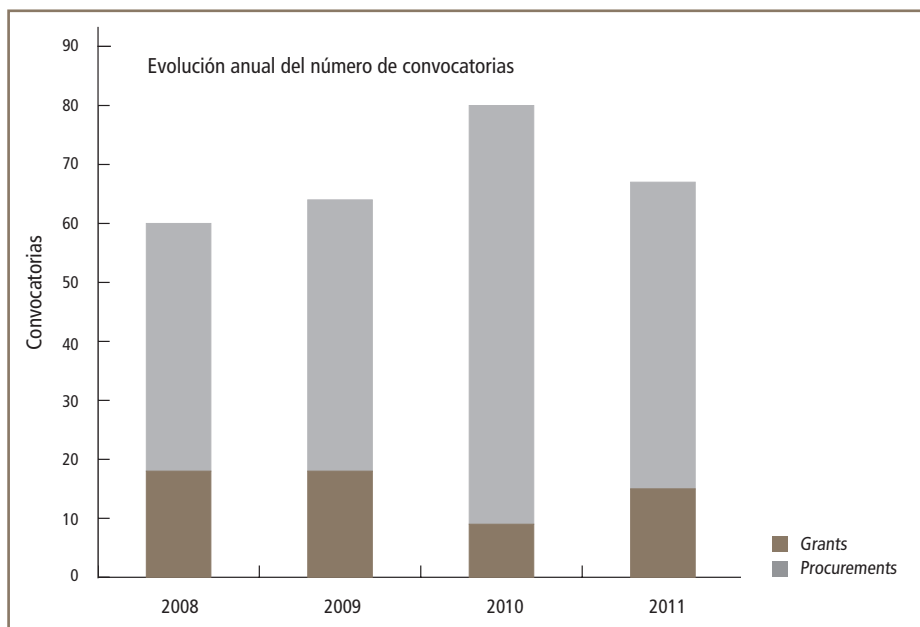


Figura 2. Evolución anual del número de convocatorias de *proposals* y *tenders*.

Para incrementar tanto el número como grado de participación de las organizaciones españolas, la AESAN está llevando a cabo una labor de armonización y ampliación de la Lista española. Dicha armonización tiene como fin reducir el número de organizaciones pequeñas o sin capacidad legal por sí mismas de firmar los convenios con EFSA a favor de organizaciones más grandes, entidades legales en sí mismas y con mayores posibilidades, por tanto, de participación. Además, entre las actividades realizadas por AESAN para mejorar la participación española en las convocatorias de artículo 36, se han realizado varias jornadas informativas en las que se ha contado con la participación de EFSA, de organizaciones españolas con experiencia en este tipo de convocatorias, así como en las de *procurements* y con la participación de representantes de otras organizaciones europeas con amplia experiencia en este campo, como ANSES. En estas jornadas, han participado representantes de las organizaciones españolas de la Lista de artículo 36, así como representantes de organizaciones que han demostrado su interés en formar parte de dicha lista y miembros del Comité Científico de AESAN.

La participación en ambos tipos de convocatorias (*grants* y *procurements*) se puede realizar a título individual (una única organización) o mediante consorcios formados por varias organizaciones, del mismo país o de países diferentes (Tabla 3).

Tabla 3. Participación española en convocatorias de *grants* y *procurements* (2007-2010)

Año	Grants o Procurements con participación española	Nº de organizaciones españolas
2007	1	2 (CReSA y Universidad Complutense de Madrid)
2008	1	1 (CReSA)
2009	2	1 (IRTA)
2010	0	0

Fuentes: (EFSA, 2008a, 2009a, 2010a, 2011b).

Cooperación científica a nivel individual

1. Base de Datos de Expertos

La Base de Datos de Expertos (EBD, en sus siglas en inglés) se puso en funcionamiento en junio de 2008. Su objetivo principal es permitir que todos aquellos expertos, con experiencia demostrable, que trabajan en el campo de actuación de EFSA, formen parte de una base de datos de científicos externos que pueden ayudar a la Autoridad y a los Estados miembros en sus actividades.

El número de expertos incluidos en la EBD, desde su creación, ha ido creciendo sostenidamente a un ritmo de unas 100 solicitudes de entrada al mes. Las solicitudes son posteriormente evaluadas y EFSA determina la conveniencia de incluir o no al experto en la Base de Datos. Hasta la fecha de publicación del último informe relativo a la EBD (EFSA, 2011d), se han incluido 2.600 expertos. De ellos, un 92% pertenece a organizaciones científicas diversas, un 4% son autónomos, un 3% jubilados y un 1% indicó estar desempleado. De los expertos pertenecientes a organizaciones científicas, un 38% declaró trabajar en universidades y otras instituciones académicas, un 32% en organizaciones gubernamentales (por ejemplo, agencias nacionales de seguridad alimentaria), un 17% en otras instituciones públicas, un 7% en instituciones de carácter privado, un 3% en organizaciones no gubernamentales y el 3% restante a fundaciones y otro tipo de instituciones (EFSA, 2011d). En octubre de 2011, había 150 expertos españoles inscritos en la EBD.

De manera general, todas las áreas de trabajo de EFSA están cubiertas por la EDB. Ciertos campos, como "nuevas tecnologías" o "sanidad vegetal" parecen ser áreas que necesitan un cierto refuerzo en el número de expertos adscritos, junto con "OGM", "toxicología" y "evaluación de la exposición".

Los expertos de la EBD pertenecen a una gran variedad de países. En su mayoría proceden de la Unión Europea, aunque también hay una amplia representación de países como Estados Unidos, Canadá o Australia. De igual manera, aunque en menor número, también están representados los Países candidatos a la UE (Turquía, Croacia y Antigua República Yugoslava de Macedonia).

Desde su establecimiento en 2008, gran parte de la promoción de la EBD ha sido realizada por los Puntos Focales.

Para inscribirse en dicha Base de Datos como experto, se debe realizar una solicitud a través de la página web de EFSA, en la que se aportan datos sobre la experiencia científica del candidato, publicaciones y otros aspectos de interés (EFSA, 2011e).

2. Comité científico y Paneles científicos de EFSA

Comité científico

La labor del Comité Científico es apoyar a los Paneles científicos de EFSA en temas científicos de carácter horizontal, así como aconsejar a la Dirección Ejecutiva de la Autoridad.

Igualmente, es responsable de la coordinación general de las opiniones científicas de los Paneles y centra sus esfuerzos en el desarrollo de metodologías de evaluación del riesgo armonizadas en aquellos campos en los que las estrategias generales y habituales de la UE no están aún definidas; por ejemplo, los riesgos emergentes, la evaluación de la exposición, el abordaje del margen de exposición en sustancias que son tanto genotóxicas como carcinogénicas, o los aspectos científicos y de procedimiento que aseguren la transparencia de EFSA en las evaluaciones del riesgo.

El Comité Científico elabora opiniones científicas y proporciona consejo a los gestores del riesgo. Para ello, trabaja de manera independiente y transparente, realizando su tarea en respuesta a peticiones por parte de los gestores del riesgo pero también por iniciativa propia. Todos los trabajos se realizan en base a unos términos de referencia. Con frecuencia, el Comité Científico organiza Grupos de Trabajo que implican a científicos externos, los cuales pueden proceder de la EBD.

Para realizar su trabajo, el Comité se reúne regularmente en sesiones plenarios en las que se discute el trabajo y se adoptan las opiniones científicas. Cada opinión surge de un proceso colectivo de toma de decisiones en el que cada miembro del Comité tiene igualdad de voto.

Actualmente, el Comité está formado por 16 miembros, de los cuales, diez son los presidentes de los Paneles científicos de EFSA y los otros seis son científicos independientes. Los miembros del Comité son elegidos por el Consejo de Dirección de EFSA por un periodo renovable de tres años. Los nombramientos se basan en la excelencia científica de candidatos seleccionados tras un proceso abierto de convocatoria de renovación. En el Comité actual (2009-2012) no hay representación española.

La Unidad del Comité Científico de EFSA (*Scientific Committee Unit*) proporciona apoyo administrativo y científico al Comité y puede llevar a cabo otros proyectos dentro de las competencias de EFSA. La Unidad puede elaborar también trabajos científicos en nombre de la Autoridad, por ejemplo en respuesta a peticiones urgentes de asesoría científica.

En lo que se refiere a la cooperación con las autoridades nacionales de los Estados miembros, ésta se potencia mediante la subcontratación. Ejemplos de ello serían los recientes contratos para colaboración en los trabajos de terminología de evaluación de riesgo y aplicabilidad de los datos fisicoquímicos, la Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR, en sus siglas en inglés) y la extrapolación del umbral en la evaluación del Umbral de Preocupación Toxicológica (TTC, en sus siglas en inglés).

Paneles científicos

A diferencia del Comité Científico, cuya labor se centra en temas de naturaleza científica general, los Paneles tienen atribuciones científicas especializadas. En la actualidad, existen diez Paneles científicos en EFSA:

- Sanidad y bienestar animal (AHAW).
- Riesgos biológicos (BIOHAZ).
- Contaminantes (CONTAM).

- Sanidad vegetal (PLH).
- Piensos (FEEDAP).
- Nutrición (NDA).
- Aditivos alimentarios y fuentes de nutrientes añadidos a los alimentos (ANS).
- Materiales en contacto con los alimentos, saborizantes, enzimas y coadyuvantes alimentarios (CEF).
- Organismos Modificados Genéticamente (GMO).
- Pesticidas (PPR).

Cada uno de estos paneles recibe el apoyo administrativo de la Unidad correspondiente, del mismo nombre.

Los paneles están formados por expertos europeos de diferentes nacionalidades con experiencia en las áreas de interés. Al igual que ocurre con el Comité Científico, los miembros son elegidos por el Consejo de Dirección de EFSA por un periodo renovable de tres años en base a la excelencia científica de candidatos seleccionados tras un proceso abierto de convocatoria de renovación.

Frecuentemente, los Paneles solicitan la ayuda de expertos externos para la formación de Grupos de Trabajo.

Los Paneles elaboran opiniones sobre temas de evaluación del riesgo dentro de su temática, sobre dossieres de evaluación de sustancias y productos y también elaboran directrices. Puesto que la base normativa de cada una de estas tres áreas principales de trabajo es diferente, la cooperación con los Estados miembros se organiza de distinto modo.

En relación a las evaluaciones de riesgo generales, cuando se requiere de cooperación científica ésta se apoya en la subcontratación, especialmente a través de *grants* (es decir, convocatorias de artículo 36; ver Tabla 2). Aunque también se realiza compartiendo los mandatos con las redes de EFSA, organizando jornadas y talleres para discutir las estrategias de abordaje de los mandatos o para discutir los borradores de las opiniones científicas. EFSA organiza también proyectos específicos de recogida de datos para tener la certeza de que dispone de los mejores datos tanto de las organizaciones científicas de los Estados miembros como de otras partes implicadas. Además, invita a las autoridades competentes de los Estados miembros a compartir sus evaluaciones de riesgo en la Plataforma de Intercambio de Información (IEP). De igual manera, las autoridades competentes nacionales pueden participar en consultas públicas y dirigidas sobre borradores de opiniones. Las opiniones finales pueden presentarse en el Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y la Sanidad Animal (SCFCAH, en sus siglas en inglés) para su discusión, cuando así se requiere, potenciando aún más el entendimiento mutuo entre los Estados miembros y la Autoridad. Además, las redes específicas proporcionan un foro para los Paneles de EFSA, las Unidades implicadas y los expertos de las autoridades competentes. Como resultado de estas discusiones, en algunos casos se han producido automandatos en los Paneles sobre áreas de interés mutuo.

La evaluación de productos, sustancias y alegaciones que deben ser evaluadas o re-evaluadas de acuerdo con la legislación europea es un área de trabajo que ha ido creciendo sostenidamente en los últimos años, llegando a suponer una importante carga de trabajo para la Autoridad, puesto que

en algunos casos, como las evaluaciones de las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables (UE, 2006), recaen directamente en EFSA. En 2009, supusieron un 68% del total de resultados científicos de la Autoridad y precisaron de una cantidad, cada vez mayor de recursos (EFSA, 2011d). Además de las disposiciones legales que afectan a este área dentro del Reglamento fundacional de EFSA, existe numerosa legislación sectorial específica. La cooperación en este área se realiza mediante varios métodos. En primer lugar mediante subcontratación; en este caso, especialmente mediante *procurements* (contratos). En segundo lugar, mediante la realización de trabajo preliminar por parte de las autoridades competentes de los Estados miembros, cuando esté previsto en la legislación sectorial, junto con la recogida de datos sobre sustancias específicas. Esta recogida de datos se realizará siempre que no haya solicitantes implicados (por ejemplo, en re-evaluaciones). Y, en tercer lugar, mediante la evaluación de los comentarios recibidos de las autoridades nacionales de los Estados miembros sobre las solicitudes y dosieres.

Otras áreas de cooperación científica

1. Programas habituales de recopilación de datos

Además de las convocatorias específicas y de duración determinada de recopilación de datos (*calls for data*) que EFSA publica y que son distribuidas por los Puntos Focales de cada país, existen diversos programas continuados de recopilación de datos. La recogida de datos fiables, representativos y numerosos es fundamental para la realización de las evaluaciones de riesgo.

La recogida de datos en relación a los alimentos y los piensos tiene su base y su mandato tanto en el Reglamento fundacional de EFSA (UE, 2002) como en la extensa legislación comunitaria específica, como por ejemplo, la Directiva 2003/99/CE (UE, 2003) o el Reglamento (CE) N° 396/2005 (UE, 2005). Para coordinar la recogida de datos, se han establecido redes con representantes de las instituciones de los Estados miembros. Para asegurar la validez de los datos, es esencial contar con métodos apropiados para su análisis. Para ello, EFSA tiene encomendada, además, la tarea de dar recomendaciones a los Estados miembros y a la Comisión Europea para mejorar la compatibilidad técnica de los datos que recibe. La compatibilidad técnica es un punto sobre el que el Reglamento fundacional de EFSA (UE, 2002) hace especial hincapié y que afecta tanto a la recogida de datos, como a la transferencia, almacenamiento y recuperación de los mismos. Para poder asegurar que los datos recogidos son de calidad suficiente para su uso posterior, es necesario emplear una metodología uniforme y predefinida en la recogida de los mismos. EFSA ha establecido ciertos grupos de trabajo para el desarrollo de protocolos armonizados de recogida de datos en temas específicos.

En base a los programas de recogida de datos, EFSA publica una serie de documentos, algunos de ellos con carácter anual, como el *Community Zoonoses Report*, elaborado en colaboración con el Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (ECDC) o el *Annual Report on Pesticides Residues in food*. Otros documentos se elaboran *ad hoc*, según la necesidad que haya de ellos, como aquellos que se realizan sobre determinados microorganismos o algunos contaminantes. Este tipo de informes permiten tanto la caracterización como el control de los riesgos. Por tanto, ayudan en la elaboración de las evaluaciones de riesgo y sirven también para comprobar el cumplimiento de las medidas de gestión del mismo.

Las principales actividades actuales de recogida de datos se centran en la exposición a través de los alimentos a contaminantes microbiológicos y químicos, a plaguicidas y a medicamentos veterinarios. En este sentido, están surgiendo nuevas actividades, principalmente relacionadas con el control de sustancias reguladas tras su puesta en el mercado; por ejemplo, los aditivos alimentarios o los datos de control de exposición ambiental a OMG.

Para poder realizar evaluaciones de la exposición y evaluaciones de riesgo cuantitativas, es necesario poder combinar los datos de aparición de contaminantes químicos, residuos o agentes microbianos con los datos de consumo de alimentos. Por lo que las necesarias actividades de armonización de las metodologías de trabajo se complican al afectar a diferentes temáticas.

Zoonosis, resistencia a antimicrobianos y brotes alimentarios

Para la realización del informe anual sobre zoonosis, resistencia a antimicrobianos y brotes alimentarios, en colaboración con el ECDC, EFSA proporciona a los Estados miembros unas directrices generales. Además, tiene publicadas especificaciones armonizadas para el control y publicación de los datos sobre agentes zoonóticos en alimentos y poblaciones animales, brotes alimentarios y *Escherichia coli* verotoxigénica y *Yersinia enterocolitica* en poblaciones animales. De igual manera, se han publicado convocatorias de proyectos de artículo 36 que proporcionan nuevas directrices para el control y la publicación armonizada de datos de parásitos zoonóticos, fiebre Q, rabia, etc.

Además, EFSA ha elaborado también protocolos y ha analizado datos procedentes de una serie de encuestas preliminares sobre agentes zoonóticos en poblaciones animales y alimentos, cuyos resultados se emplean para establecer los objetivos europeos de reducción de la prevalencia de *Salmonella* en varias especies animales. También se emplean como base si se necesitan medidas de gestión para otros agentes zoonóticos.

En lo relativo a España, la AESAN es la autoridad competente, para la coordinación con las comunidades autónomas, en lo que respecta a asegurar la adecuada vigilancia de las zoonosis transmitidas por alimentos destinados al consumo humano.

La actividad de AESAN en este campo persigue dar debido cumplimiento a lo establecido en el artículo 3 del Real Decreto 1940/2004 y el artículo 9 de la Directiva 2003/99/CE, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos, y consiste en coordinar la recogida de información por las comunidades autónomas, analizarla, realizar los estudios precisos y ser el punto de contacto con la EFSA para las actividades y proyectos que en control de zoonosis en alimentos se desarrollan.

Además, los datos de investigación de agentes zoonóticos en alimentos se recogen con carácter anual de las comunidades autónomas y se remiten a la Comisión Europea mediante el sistema de comunicación de datos elaborado por EFSA desde 2005, con el objeto de obtener datos uniformes y comparables entre todos los Estados miembros.

Residuos de plaguicidas

De acuerdo con el artículo 32 del Reglamento (CE) Nº 396/2005 (UE, 2005), EFSA es responsable de la preparación del *Annual Report on Pesticides Residues*. Esta tarea consta de la recogida de los resultados de los análisis de control de pesticidas realizados en los Estados miembros y los países del Espacio

Económico Europeo (EEE), el análisis de los datos recogidos y una valoración de la exposición real de los consumidores europeos a los residuos de plaguicidas.

A diferencia de lo que ocurre con la evaluación del riesgo realizada dentro del marco de los Límites Máximos de Residuos (LMR), que emplean la concentración del residuo medida en pruebas de campo supervisadas, la evaluación real de la exposición utiliza los residuos "reales" cuantificados en productos del mercado europeo.

Desde 2010, EFSA recibe los datos de control en un nuevo formato *Standard Sample Description* (SSD), que permite enviar los datos y la información de forma desagregada, así como unificar la estructura de los datos de todos los Estados miembros, obteniéndose una información de calidad y fácilmente comparable a nivel de determinación individual. En 2010, se analizaron más de 60.000 muestras de frutas, hortalizas, cereales y otros alimentos de origen vegetal y animal en busca de residuos de aproximadamente 600 pesticidas. Todo ello dio lugar a más de 17 millones de determinaciones. La recogida anual de datos de residuos de pesticidas permitirá crear una base de datos que se podrá emplear para analizar las tendencias en relación a la aparición de residuos y la exposición de los consumidores.

En España, AESAN es el punto de contacto con EFSA y con la Comisión en materia de recogida de datos resultantes del Programa de Vigilancia y Control de Residuos de Plaguicidas, así como el organismo de coordinación con las comunidades autónomas. Por ello para facilitar la incorporación del nuevo formato establecido por EFSA, en 2010 AESAN desarrolló una base de datos nacional totalmente adaptada al SSD, que permite recopilar la información desde todas las unidades de las comunidades autónomas y transferirla a EFSA de forma rápida y eficaz.

Por otro lado, desde el año 2009, AESAN participa en la Red de Control de Residuos de Plaguicidas.

Base de datos armonizada de consumo de alimentos

El proceso de evaluación del riesgo se compone de cuatro actividades diferentes pero muy relacionadas: la identificación del peligro, la caracterización del peligro, la evaluación de la exposición y la caracterización del riesgo. La evaluación de la exposición requiere la determinación de la exposición del consumidor a un peligro determinado. En lo relativo a la alimentación humana, es necesario tener información sobre la concentración de las sustancias peligrosas en los alimentos y combinar esta información con datos sobre la cantidad de alimentos que se consumen. Por tanto, la calidad de la evaluación del riesgo está directamente influenciada por la precisión, el detalle y la posibilidad de comparación de los datos de consumo disponibles.

En 2005, durante un coloquio científico (EFSA, 2005), el Comité Científico de EFSA recomendó la creación de una base de datos de consumo armonizada a nivel paneuropeo. Con la colaboración de los Estados miembros, EFSA puso en marcha la Base de Datos Concisa Europea de Consumo de Alimentos (*Concise European Food Consumption Database*), operativa desde febrero de 2008. Esta base de datos contiene información de encuestas alimentarias individuales de 19 países europeos, aunque los datos no se han combinado porque se emplearon diferentes métodos de recogida de la información; además, esta base de datos sólo ofrece información sobre consumo agrupado en grandes categorías de alimentos. Por ello, a finales de 2008, EFSA inició un proyecto para establecer la Base de Datos Exhaustiva de Consumo de Alimentos (*Comprehensive European Food Consumption Database*), con datos de las

encuestas alimentarias nacionales más recientes. En ese año, EFSA realizó también una convocatoria de artículo 36 centrada en consumo en niños. La nueva Base de Datos Exhaustiva contiene datos de consumo de alimentos de adultos y niños de 20 y 15 Estados miembros, respectivamente.

Dada la importancia de la armonización en todas las áreas y especialmente en la clasificación de los alimentos, EFSA ha iniciado una importante tarea en este difícil campo. En primer lugar, en 2009 (EFSA, 2009b), publicó una guía en la que se recogen los principios generales para la recogida de datos de consumo en las encuestas. En 2011 (EFSA, 2011a), se publicó un informe científico sobre el *FoodEx*, el sistema de clasificación de alimentos para su aplicación en la Base de Datos Exhaustiva de Consumo de Alimentos.

Esta Base de Datos es, actualmente, la más amplia y la más actualizada de las disponibles en la UE. Sin embargo, cuenta con la dificultad de las diferentes metodologías empleadas por los Estados miembros colaboradores y sus organizaciones científicas, por lo que los datos son inadecuados para realizar análisis a nivel europeo y comparaciones entre países. Por todo ello, la recogida de datos precisos y armonizados en Europa se considera una prioridad de cooperación entre EFSA y los Estados miembros, así como con otros países y se ha desarrollado un proyecto de establecimiento de un sistema de recogida de datos de consumo de alimentos estandarizado en la UE: el EUMENU. Paralelamente, para incorporar nuevos datos a la Base de Datos, EFSA ha abierto una convocatoria de *procurement: Update of EFSA Comprehensive European Food Consumption Database*.

La actividad de AESAN en este campo consiste en la participación en el Grupo de Expertos de Datos de Consumo, integrado en el grupo de redes de apoyo a las unidades de EFSA; en concreto, en relación con la unidad *Dietary and chemical monitoring*. Además, AESAN está trabajando para la incorporación de los datos nacionales de consumo de alimentos, obtenidos a través de la encuesta ENIDE (Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española), a la Base de Datos Exhaustiva de Consumo de Alimentos, lo cual requiere la clasificación de todos los datos de acuerdo con el sistema *FoodEx*.

2. Intercambio de información científica

Plataforma de Intercambio de Información

La Plataforma de Intercambio de Información (IEP, en sus siglas en inglés) se creó en 2008 para facilitar el intercambio de información sobre actividades de carácter científico en los Estados miembros. La Plataforma contiene documentos relativos a evaluaciones de riesgo, planes de trabajo, manuales de crisis, manuales de calidad y perfiles de los países.

A fecha de agosto de 2011, se habían incorporado a la IEP 945 documentos, de los cuales, casi 800 corresponden a resultados de evaluaciones de riesgo y documentos similares. Por parte de España, AESAN gestiona la incorporación de datos a la IEP y ha incorporado todos los informes elaborados por su Comité Científico desde la creación de la Plataforma.

Para mejorar y revisar el desarrollo de la IEP, en septiembre de 2008 se creó un Grupo de Trabajo dentro de la red de Puntos Focales encargado de realizar propuestas de desarrollo de la Plataforma. En un principio, únicamente los miembros del Consejo Consultivo y de los Puntos Focales tenían acceso a la IEP. Durante el año 2009, se amplió el acceso de lectura a todos los miembros de los Paneles científicos y a contactos individuales propuestos por el AF. Por ello, la incorporación de la mayoría de los documentos existentes en la Plataforma ha sido realizada por los Puntos Focales.

Planes de trabajo de las autoridades competentes nacionales

El objetivo general de esta iniciativa es mejorar el conocimiento sobre las actividades planificadas a nivel nacional y evitar posibles duplicidades de trabajo. Originalmente, los documentos se compartían en la IEP; sin embargo, existe una gran variedad en la forma en la que los diferentes Estados miembros y sus autoridades nacionales competentes elaboran sus planes de trabajo, por lo que se dificultaba en gran medida la posibilidad de resumir todos los documentos para realizar una valoración armonizada de los mismos.

Por ello, la Unidad de Cooperación Científica de EFSA ha elaborado un formato armonizado y sencillo en colaboración con los puntos focales, en forma de tabla. Este sistema permite enumerar las actividades planificadas en evaluación de riesgo, así como de investigación y recogida de datos y es el sistema elegido por AESAN para incorporar la información sobre sus planes de trabajo.

Gracias a ambos métodos, existe actualmente información en la IEP de los planes de trabajo y actividades planificadas de 18 países.

Jornadas y reuniones con las autoridades competentes nacionales

Cuando resulta conveniente, EFSA invita a expertos nacionales nominados por las autoridades nacionales competentes en cada Estado miembro a reuniones en las que se discuten y se comparten experiencias científicas, también en temas sensibles o controvertidos. Este tipo de actividades ayuda a EFSA en su trabajo, al permitir el intercambio de puntos de vista y la obtención de información de expertos muy cualificados.

Uno de los ejemplos más conocidos de este tipo de reuniones es el de la evaluación de la seguridad del aspartamo. El aspartamo es un edulcorante autorizado desde hace varios años en varios países y sobre el cual EFSA elaboró una opinión científica en 2006 (EFSA, 2006). Por iniciativa de EFSA, junto con el Comité Consultivo, 18 expertos de diez organismos de evaluación del riesgo diferentes fueron invitados a tres reuniones celebradas entre noviembre de 2009 y enero de 2010.

Otro ejemplo de eventos conjuntos es el celebrado en Sevilla, en febrero de 2010, organizado entre EFSA y la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN): *Science Supporting Risk Surveillance of Imports*; o el celebrado en octubre de 2008 y organizado junto con la Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria (actualmente, ANSES): *Assessment of the health risks of food, animal and plant imports in the European Union*.

Por último, un evento conjunto organizado por EFSA y la Autoridad Holandesa de Seguridad Alimentaria y Productos de los Consumidores (VWA) en 2008, dio lugar a un número especial del *International Journal on Food Microbiology* (Vol.139, Suppl.1, 2010), con varios artículos sobre evaluación del riesgo microbiano.

Coloquios científicos de EFSA

Los coloquios científicos se iniciaron en 2004, con el propósito de crear un foro de debate y discusión científica entre científicos de la UE y otros países. EFSA organiza, al menos, un coloquio al año. La temática varía según los temas de interés en el área de los alimentos y los piensos y el objetivo final es profundizar en el conocimiento de dichos temas.

Cada coloquio cuenta con un comité organizador que prepara las notas para los participantes y establece una serie de puntos de discusión. Además, en cada evento se prevén grupos de trabajo separados, con sesiones plenarias en las que discutir las conclusiones de cada grupo. En estas sesiones se deciden las conclusiones generales y la conveniencia de realizar alguna recomendación a EFSA y los paneles implicados. Finalmente, se elabora un informe final que será publicado por EFSA.

Hasta el momento se han celebrado 16 coloquios científicos, el último de ellos en junio de 2011.

Consultas públicas

La realización de consultas públicas sobre borradores de opiniones científicas es parte del compromiso de transparencia, calidad científica y eficacia de EFSA. Fomentan la interacción de EFSA con los ciudadanos europeos, los consumidores y todas las partes implicadas, incluidas las autoridades nacionales competentes. Para facilitar la participación de todas las partes interesadas, EFSA publica estas consultas en su página web, además de comunicarlas a los miembros del AF y a los Puntos Focales para su difusión a nivel nacional.

En un principio, aunque estas consultas públicas podrían no ser consideradas como estrategias de cooperación científica en sí, entran dentro de esta categoría pues, en la mayoría de los casos, son las organizaciones científicas de los Estados miembros las que contribuyen mayoritariamente con sus observaciones.

Las consultas públicas se realizan cuando EFSA recibe un nuevo tipo de pregunta, por ejemplo en áreas en las que EFSA no se ha pronunciado antes. Los temas científicos emergentes o complejos serían otro ejemplo de situaciones en las que EFSA podría realizar una consulta pública.

Las consultas públicas se iniciaron en 2005 y, desde entonces, se han realizado 72. Entre ellas, cabe destacar las directrices sobre evaluación de la seguridad de plantas y sus preparados destinados a su uso como complementos alimenticios (2008); borradores de las opiniones científicas sobre Valores de Referencia Alimentarios (anteriormente denominados Ingestas de Referencia en la Población) (2009) y sobre la resistencia antimicrobiana debida a alimentos como riesgo biológico (2008) o los aspectos de bienestar de la selección genética en broiler (2010).

Necesidades de formación

La Estrategia para la Cooperación y Establecimiento de Redes (EFSA, 2006) indica que EFSA debe establecer un programa de cursos sobre evaluación de riesgos que impliquen a expertos de los Estados miembros. Esta necesidad fue reiterada en la revisión interna de este documento realizada en 2008, a raíz de una petición de los Estados miembros a EFSA de aumentar las actividades de formación.

Para ello, EFSA realizó una iniciativa para conocer cuáles eran las áreas en las que los Estados miembros consideraban que era más necesaria la formación. La Unidad de Cooperación Científica, junto con los Puntos Focales, analizó las oportunidades de formación en evaluación de riesgos en seguridad alimentaria ofrecidas por las principales instituciones europeas e internacionales y por cada Estado miembro. A nivel nacional, los países informaron a la Unidad de Cooperación Científica de EFSA, a través de sus Puntos Focales, de un gran número de oportunidades de formación, sobre una amplia variedad de temas.

En general, los Estados miembros solicitaron principalmente formación en temas generales de evaluación de riesgos. Aparte del ECDC en Estocolmo, hay pocas organizaciones europeas o internacionales que tengan un programa concreto de formación en evaluación de riesgo. Sin embargo, sí existe una oferta de jornadas y seminarios *ad hoc*. De igual manera, EFSA ha organizado ejercicios en colaboración con las autoridades nacionales competentes y la Comisión Europea para practicar y poner a prueba la colaboración en respuesta a solicitudes urgentes. Habitualmente, estos ejercicios toman la forma de ejercicio de crisis.

Desde el año 2006, la Comisión Europea ofrece un programa de formación en Seguridad Alimentaria denominado *Better training for safer food*, que se centra principalmente, en temas de gestión del riesgo y control y que tiene como objetivo el personal de las autoridades nacionales competentes de los Estados miembros y países candidatos.

Otro programa de formación que también recibe financiación de la Comisión Europea, es el *Toxicology Risk Assessment Training (TRISK)*, que ofrece cursos de formación en el área de la evaluación de riesgo toxicológico.

En conclusión, aunque diferentes organizaciones ofertan una cierta variedad de actividades de formación, parece existir una limitación en la oferta de formación en los principios generales de la evaluación del riesgo en seguridad alimentaria. Por ello, recientemente, EFSA ha organizado un grupo de trabajo cuya tarea es desarrollar un módulo de formación en principios y métodos generales de evaluación de riesgo. Estos módulos serán implementados por el personal de EFSA y expertos científicos externos.

Es necesario tener en cuenta que EFSA no tiene el mandato de organizar tareas de formación para expertos fuera del personal de la Autoridad y la Comisión Europea ya tiene un programa en esta área. En este contexto, EFSA ha reforzado la colaboración con el servicio de la Comisión responsable de los programas de formación en el área de la seguridad alimentaria para ampliar las oportunidades ofertadas.

Referencias

- EFSA (2005). European Food Safety Authority. EFSA 3rd Scientific Colloquium Report European Food Consumption Database-Current and medium to long-term strategies. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/110e.htm> [acceso: 6-10-11].
- EFSA (2006). European Food Safety Authority. Strategy for Cooperation and Networking between the EU Member States and EFSA. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/keydocs/docs/msstrategy.pdf> [acceso: 6-10-11].
- EFSA (2008a). European Food Safety Authority. Annual List of Grant Agreements 2007. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/art36grants/docs/art36grantsagreements2007.pdf> [acceso: 6-10-11].
- EFSA (2008b). European Food Safety Authority. Plan Estratégico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria para 2009-2013. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/corporate/doc/stratplan09es.pdf> [acceso: 6-10-11].
- EFSA (2009a). European Food Safety Authority. Annual List of Grant Agreements 2008. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/art36grants/docs/art36grantsagreements2008.pdf> [acceso: 6-10-11].
- EFSA (2009b). Guidance of EFSA. General Principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey. *EFSA Journal*. doi:10.2903/j.efsa.2009.1435.
- EFSA (2010a). European Food Safety Authority. Annual List of Grant Agreements 2009. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/art36grants/docs/art36grantsagreements2009.pdf> [acceso: 6-10-11].

- EFSA (2010b). European Food Safety Authority. Decision concerning the establishment and operation of European Networks of scientific organizations operating in the fields within the Authority's mission. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/keydocs/docs/networksoperation.pdf> [acceso: 6-10-11].
- EFSA (2011a). Evaluation of the FoodEx, the food classification system applied to the development of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Database. *EFSA Journal*. doi:10.2903/j.efsa.2011.1970.
- EFSA (2011b). European Food Safety Authority. Annual List of Grant Agreements 2010. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/art36grants/docs/art36grantsagreements2010.pdf> [acceso: 6-10-11].
- EFSA (2011c). European Food Safety Authority. List of competent organisations designated by the Member States which may assist the Authority with its mission. Decisión del Consejo de Dirección de EFSA. Adoptada el 16 de junio de 2011. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/art36grants/docs/art36listg.pdf> [acceso: 6-10-11].
- EFSA (2011d). European Food Safety Authority. Technical report of EFSA on Scientific Cooperation between EFSA and Member States: Taking Stock and Looking Ahead. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/97e.pdf> [acceso: 6-10-11].
- EFSA (2011e). European Food Safety Authority. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/networks/expertdb.htm> [acceso: 6-10-11].
- Ley 11/2001 de 5 de julio, por la que se crea la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. BOE 161 de 6 de julio de 2001, pp: 24250-24255.
- Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos. BOE 237 de 1 de octubre de 2004, pp: 32772-32777.
- UE (2002). Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. DO L 31 de 1 de febrero de 2002, pp: 1-24.
- UE (2003). Directiva 2003/99/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo. DO L 325 de 12 de diciembre de 2003, pp: 31-40.
- UE (2004). Reglamento (CE) N° 2230/2004 de la Comisión, de 23 de diciembre de 2004, por el que se establecen las normas de desarrollo del Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto a la interconexión de las organizaciones que actúan en los ámbitos comprendidos en el cometido de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. DO L 379 de 24 de diciembre de 2004, pp: 64-67.
- UE (2005). Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. DO L 70 de 16 de marzo de 2005, pp: 1-16.
- UE (2006). Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. DO L 404 de 30 de diciembre de 2006, pp: 9-25.

Si desea citar un Informe del Comité Científico de la AESAN en una publicación científica, le sugerimos que siga este modelo, adaptándolo al estilo de citación requerido por la publicación de destino.

Rodríguez-Ferri, E., Badiola-Díez, J.J., Cepeda-Sáez, A., Domínguez-Rodríguez, L., Otero-Carballeira, A. y Zurera-Cosano, G. Grupo de trabajo. (2009). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la evisceración de los lagomorfos. Revista del Comité Científico de la AESAN, 9, pp: 31-38.

Abreviatura revista: Rev. Com. Cient. AESAN.



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE SANIDAD, POLÍTICA SOCIAL
E IGUALDAD



Agencia
Española de
Igualdad,
No Discriminación e
Inclusión