revista del Comité Científico de la aesan

Nº 16

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
agencia española de seguridad alimentaria y nutrición

GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD
agencia española de seguridad alimentaria y nutrición

Revista del Comité Científico de la AESAN

Madrid, 2012

revista del Comité Científico de la asesan

Nº 16

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 "Referencias" que 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.

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
Mª Rosario Martín de Santos
Emilio Martínez de Victoria Muñoz
Mª 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
Mª Carmen Vidal Carou

Coordinadores de la edición
Ricardo López Rodríguez
Marta Pérez González
Vicente Calderón Pascual

Edita
AESAN
Alcalá, 56. 28071. Madrid
Correo electrónico: uccaesan@msssi.es
Diseño y maquetación
Montserrat Gómez
NIPO: 682-12-001-X
ISSN: 1885-6586
ISSN: 1885-6586

Índice

Prólogo 9

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a criterios de estimación de concentraciones para la discusión de propuestas de límites de migración de determinados metales pesados y otros elementos de objetos de cerámica destinados a entrar en contacto con los alimentos 11

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) con relación a las medidas de control para reducir la presencia de *Campylobacter* spp. en carne fresca de aves (pollo) 21

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre riesgos microbiológicos asociados al consumo de frutos obtenidos de *Fragaria* spp. y *Rubus* spp. 57

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicos/productores de toxinas Shiga/enterohemorrágicos (VTEC/STEC/EHEC) 71

Colaboraciones

Técnica de cribado con Cinco Placas para la detección de residuos de antibióticos 101

Validación del método de cribado de las Cinco Placas para detección de residuos de antibióticos en alimentos. Estimación del límite de detección 109

Prólogo

Es para mí un honor contribuir con este prólogo a una nueva edición de la revista del Comité Científico de la AESAN, donde se sigue poniendo de manifiesto la excelencia de su labor mediante la elaboración de dictámenes científicos que permiten basar la gestión de los riesgos alimentarios en evaluaciones de riesgos rigurosas y de alto nivel científico.

En este nuevo número se han incluido tres informes de evaluaciones de riesgos referentes a microorganismos de gran interés y relevancia en el panorama actual dentro de la seguridad alimentaria. El primero de ellos es el de los *E. coli* verotoxigénicos que forman un grupo de patógenos cada vez más relevantes dentro del campo de la seguridad alimentaria. Un serotipo concreto, el O104H4 causó hace un año la crisis alimentaria más importante de este siglo en la Unión Europea, con un brote principal en Alemania y otro menor en Francia por consumo de brotes de semillas producidos fuera de la Unión Europea. El Comité Científico ha realizado una extensa revisión de los datos epidemiológicos y la valoración de las posibles medidas de prevención en toda la cadena alimentaria, desde las buenas prácticas agrícolas y de higiene hasta la incorporación de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico por los operadores económicos o la formación y educación de los consumidores.

En el segundo de los informes de carácter microbiológico el Comité Científico ha revisado las medidas de control que pueden permitir la reducción de la presencia de *Campylobacter* en carne fresca de aves (pollo) y ha remarcado la necesidad de aplicar las buenas prácticas higiénicas y el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico en toda la cadena alimentaria, incluyendo también la formación de los consumidores como agentes activos en la prevención de las enfermedades de transmisión alimentaria. No hemos de olvidar que de acuerdo con el último informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria sobre zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de toxiinfecciones alimentarias, *Campylobacter* spp. es el patógeno de transmisión alimentaria responsable del mayor número de casos de toxiinfecciones alimentarias en la Unión Europea. Y preocupa además el hecho de que la tasa de notificación de casos confirmados de campilobacteriosis sigue mostrando una tendencia creciente, como en los últimos cinco años.

Los riesgos microbiológicos asociados al consumo de ciertas bayas y las posibles medidas de prevención para evitarlos también han sido objeto de la atención del Comité. De nuevo se destaca la importancia de las buenas prácticas higiénicas en su cultivo y recolección y de mantener un sistema de trazabilidad protocolizado que permita determinar rápidamente el agente causal en el caso de la aparición de un brote producido como consecuencia de su consumo.

Junto a estos informes sobre riesgos microbiológicos, el Comité ha valorado una propuesta sobre criterios de estimación de concentraciones para la discusión de propuestas de límites de migración

de determinados metales pesados y otros elementos desde objetos de cerámica destinados a entrar en contacto con los alimentos, que servirá de apoyo para las discusiones que se llevan a cabo a nivel europeo.

Por último, en este número se incluyen dos colaboraciones externas producto de la actividad como Laboratorio Nacional de Referencia del Centro Nacional de Alimentación que permitirán tanto a los laboratorios de control oficial como a otros laboratorios contar con información actual y de interés en el control de aspectos importantes de la seguridad alimentaria.

Ángela López de Sá Fernández
Directora Ejecutiva de la AESAN

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a criterios de estimación de concentraciones para la discusión de propuestas de límites de migración de determinados metales pesados y otros elementos de objetos de cerámica destinados a entrar en contacto con los 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, María Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, Mª 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, Mª Carmen Vidal Carou

Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2012-004

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 23 de mayo de 2012

Grupo de Trabajo

Cristina Nerín de la Puerta (Coordinadora)
Ana María Cameán Fernández
María Rosa Martínez Larrañaga
Perfecto Paseiro Losada
Antonio Pla Martínez
Ricardo López Rodríguez (AESAN)

Resumen

La Directiva 84/500/CEE y sus modificaciones establecen los requisitos para la comercialización de materiales cerámicos destinados a entrar en contacto con alimentos, de manera que se asegure que no suponen un riesgo para el consumidor y fijan los límites máximos de migración de cadmio y plomo.

En este sentido, el avance de los conocimientos científicos hace conveniente revisar los límites de plomo y cadmio, así como las condiciones de ensayo y, por ello, la Comisión Europea está valorando la modificación de la citada Directiva.

El Comité Científico ha valorado una propuesta respecto a criterios de estimación de concentraciones para la discusión de propuestas de límites de migración de determinados metales pesados y otros elementos desde objetos de cerámica destinados a entrar en contacto con los alimentos.

Se ha valorado si los criterios utilizados en la elaboración de la propuesta eran adecuados y los ha considerado aceptables excepto en dos casos, para los cuales ha propuesto aplicar un criterio alternativo.

Palabras clave

Materiales cerámicos, metales pesados, migración.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) regarding criteria for the estimation of concentrations for the discussion of proposals for migration limits of certain heavy metals and other elements from ceramic articles intended to come into contact with foodstuffs.

Abstract

Directive 84/500/EEC and its amendments establish the requirements for the commercialisation of ceramic articles intended to come into contact with foodstuffs, in order to guarantee that they do not constitute a risk for consumers and to establish the maximum limits of migration for cadmium and lead.

In this respect, in the light of developments in scientific knowledge, it is advisable to review the lead and cadmium limits and the test conditions. Therefore, the European Commission is assessing the amendment of said Directive.

The Scientific Committee has assessed a proposal regarding criteria for the estimation of concentrations for the discussion of proposals for migration limits of certain heavy metals and other elements from ceramic articles intended to come into contact with foodstuffs.

It has assessed whether the criteria used in the preparation of the proposal are adequate, considering them to be acceptable except in two cases, for which it has put forward the application of alternative criteria.

Key words

Ceramic materials, heavy metals, migration.

1. Introducción

Los materiales cerámicos destinados a entrar en contacto con alimentos se encuentran regulados por el Reglamento (CE) Nº 1935/2004, de 27 de octubre de 2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos (UE, 2004) y, en particular, por la Directiva 84/500/CEE, de 15 de octubre de 1984, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre objetos de cerámica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios.

La Directiva 84/500/CEE (UE, 1984) fue transpuesta a nuestro ordenamiento jurídico mediante el Real Decreto 891/2006, de 21 de julio, por el que se aprueban las normas técnico-sanitarias aplicables a los objetos de cerámica para uso alimentario que, recientemente, ha sido modificado por el Real Decreto 1631/2011, de 14 de noviembre.

Estas disposiciones establecen los requisitos para la comercialización de materiales cerámicos destinados a entrar en contacto con alimentos, de manera que se asegure que no suponen un riesgo para el consumidor. En particular, se fijan los límites máximos de migración de cadmio y plomo.

El avance de los conocimientos científicos hace conveniente revisar los límites de plomo y cadmio fijados en 1984, así como las condiciones de ensayo y, por ello, la Comisión Europea esta valorando la modificación de la Directiva 84/500/CEE y la inclusión de límites de migración para otros metales pesados y otros elementos que puedan estar presentes en materiales cerámicos en cantidades elevadas o que puedan suponer un riesgo toxicológico para el consumidor.

La Comisión Europea ha establecido prioridades en el establecimiento de límites máximos para migración de metales pesados y otros elementos desde materiales cerámicos en función del posible riesgo que representan.

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha proporcionado una propuesta que representa un punto de partida para el establecimiento de límites de migración para distintos metales pesados y otros elementos que puedan estar presentes en materiales cerámicos y que pertenecen a los tres primeros grupos de prioridad de la Comisión Europea. La propuesta se ha basado en distintas fuentes documentales toxicológicas y establece una serie de concentraciones de partida para la discusión respecto al establecimiento de límites máximos de migración. Asimismo, esta propuesta se refiere a los objetos llenables incluidos en la categoría 2 establecida por el Real Decreto 891/2006.

Estas concentraciones no son una propuesta de límites máximos en si misma, sino un punto de partida sobre el que se solicita al Comité Científico que valore si los criterios utilizados en la elaboración de las propuestas de los distintos elementos son adecuados de cara a su discusión en una eventual modificación de la Directiva de objetos de cerámica destinados a entrar en contacto con los alimentos y si existen métodos analíticos que permitan llevar a cabo el control del cumplimiento de los niveles de partida propuestos.

2. Estimaciones realizadas para la propuesta de concentraciones de partida

Para realizar la propuesta de concentraciones de partida de metales pesados y otros elementos proporcionada por la AESAN, se ha asumido que un adulto de 60 kg de peso puede comer y beber al día 1 kg de alimentos en contacto con materiales cerámicos.

En la propuesta se ha tenido en cuenta la exposición de la población a estos metales pesados y otros elementos a través de otras fuentes. Además, se establecen algunos criterios para realizar la propuesta de las concentraciones de partida:

1. Cuando se conoce la exposición a estos elementos desde otras fuentes y esta es significativa pero está por debajo de la ingesta diaria tolerable *(tolerable daily intake,* TDI), se toma la cantidad que resta hasta la TDI como propuesta de concentración de partida.
2. Cuando la exposición a estos elementos desde otras fuentes está por encima de la TDI, se propone una concentración de un 10% de la TDI.
3. Sin embargo, si esta exposición a través de otras fuentes es más de dos veces la TDI, la concentración propuesta sería el 5% de la exposición, siempre y cuando esa cantidad sea menor que la TDI.

Teniendo en cuenta estas premisas, la AESAN ha proporcionado al Comité Científico la propuesta de concentraciones de partida para la discusión sobre límites máximos de migración que se resume en la Tabla 1. El Comité Científico ha valorado si los criterios utilizados en su elaboración son adecuados, sin descartar que puedan existir otros sistemas de estimación que también sean aceptables y sin que las cifras resultantes de la aplicación de estos criterios se deban entender como una propuesta de límites máximos de migración, sino como un punto de partida para su discusión, en la que se pueden tener en cuenta otros factores tales como su aplicabilidad u otras consideraciones de seguridad específicas de cada elemento.

Tabla 1. Propuesta de concentraciones de partida para discusión sobre límites máximos de migración de metales pesados y otros elementos de objetos de cerámica destinados a entrar en contacto con los alimentos

Elemento	Símbolo	µg/kg alimento
Arsénico	As	18
Cadmio	Cd	5
Cobalto	Co	45
Cobre	Cu	1.000
Manganeso	Mn	550
Mercurio	Hg	9,6
Níquel	Ni	125
Plomo	Pb	10
Selenio	Se	24
Talio	Tl	0,4

3. Valoración de las propuestas de concentraciones de partida

3.1 Valoración de los criterios para la propuesta de concentraciones de partida

Los dos primeros criterios utilizados para realizar la propuesta de concentraciones de partida se consideran adecuados (apartado 2). En lo que respecta al tercer criterio, en el caso de que la exposición exceda ampliamente más de dos veces la TDI, la aplicación del criterio inicialmente propuesto implicaría una superación excesiva de la TDI. Por ello, en este caso, cuando la exposición a través de otras fuentes sea más de dos veces la TDI, se considera más adecuado que la concentración propuesta sea un 5% de la exposición, siempre y cuando esa cantidad no supere el 10% de la TDI, en cuyo caso se tomaría ese valor del 10%.

3.2 Arsénico

3.2.1 Propuesta

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha utilizado un $BMDL_{01}$ (límite de confianza inferior al 5% de la dosis diaria que produce un incremento del 1% en la aparición de cánceres de pulmón, piel y vejiga, así como de lesiones cutáneas respecto a los controles, derivado del ajuste de un modelo matemático a los datos experimentales) de arsénico de 0,3-8 µg por kg de peso corporal y día (EFSA, 2009a). Tomando el límite más conservador, esto se traduce, en una persona de 60 kg, en un límite diario de ingesta de 18 µg.

La exposición al arsénico por otras fuentes, incluidos los alimentos, es de hasta 1,22 µg por kg de peso corporal y día (EFSA, 2009a) y, por tanto, se considera que el valor de 0,3 µg es suficientemente conservador, por lo que se obtiene una concentración de partida para la discusión del límite máximo de migración de arsénico desde materiales cerámicos de 18 µg/kg de alimento.

3.2.2 Valoración de la propuesta

Cuando no hay una ingesta diaria admisible (IDA) establecida pero se dispone del valor de la $BMDL_{01,}$ se utiliza en la propuesta el valor más bajo del rango establecido, para la $BMDL_{01}$, como concentración de partida para la discusión del límite máximo de migración. Esta forma de proceder no es exactamente la indicada en los criterios mencionados en el apartado 2. Si se considera que la ingesta diaria de As es 73,2 µg/día, y por tanto mayor a dos veces la TDI, aplicando el tercer criterio, el valor estimado sería 4 µg/kg. Sin embargo, se considera que el límite de 18 µg/kg es suficiente, al ser la $BMDL_{01}$ mucho más exigente que la TDI y además, en este caso, hay un rango de $BMDL_{01}$ muy amplio (0,3-8 µg/kg) y se ha tomado el valor inferior. La $BMDL_{01}$ se considera un parámetro muy exigente y suficientemente conservador. Los criterios utilizados para realizar la propuesta son aceptables.

3.3 Cadmio

3.3.1 Propuesta

EFSA ha establecido una ingesta semanal tolerable (*tolerable weekly intake*, TWI) de cadmio de 2,5 µg por kg de peso corporal (EFSA, 2009b, 2011). Esto se traduce, en una persona de 60 kg, en una TDI de 21,4 µg.

La exposición al cadmio a través de los alimentos oscila entre 2,04 y 3,66 µg/kg de peso corporal por semana (EFSA, 2012). Dado que esta exposición es algo superior a la TWI y aplicando el criterio establecido en el apartado 2 para proponer una concentración de partida para la discusión del límite

máximo de migración de cadmio desde materiales cerámicos, este debería quedar fijado en un 10% de la TDI: 2 µg/kg de alimento. Sin embargo, considerando que el límite establecido para algunas aguas envasadas es de 5 µg/l (UE, 1998), y que posiblemente valores más restrictivos sean difíciles de cumplir, se obtiene un valor de 5 µg/kg de alimento como valor límite para la discusión.

3.3.2 Valoración de la propuesta

Los criterios utilizados para realizar la propuesta son aceptables. El valor resultante es el límite en aguas de bebida envasadas (5 µg/l) cuya ingesta es mucho mayor que los alimentos en contacto con cerámica.

3.4 Cobalto

3.4.1 Propuesta

El RIVM *(Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu)* de Holanda ha establecido una TDI de cobalto de 1,4 µg por kg de peso corporal (RIVM, 2001) basándose en una evaluación de Vermeire et al. (1991). Esto se traduce, en una persona de 60 kg, en una TDI de 84 µg.

La exposición al cobalto por otras fuentes, incluidos los alimentos, es de 39 µg/día según datos de un estudio de dieta total llevado a cabo en Reino Unido (VKM, 2007). Al ser este valor inferior a la TDI, se toma la diferencia hasta la TDI como propuesta de una concentración de partida para la discusión del límite máximo de migración de cobalto desde materiales cerámicos: 45 µg/kg de alimento.

3.4.2 Valoración de la propuesta

Parece razonable utilizar en la propuesta los datos de ingesta de 39 µg/día (VKM, 2007). Si se considera esta ingesta, y aplicando el primer criterio (ingesta<TDI), la propuesta de concentración sería la diferencia (84-39=45 µg/kg). Los criterios utilizados para realizar la propuesta son aceptables.

3.5 Cobre

3.5.1 Propuesta

El Comité Científico de la Alimentación Humana ha estimado un nivel superior tolerable de ingesta de 5 mg por día (SCF, 2003). Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2003) ha considerado un TUIL *(tolerable upper intake level)* de 10 mg/día basándose en un informe de IOM (2001). Dado que en el establecimiento del valor de 5 mg se han tenido en cuenta factores de seguridad, el valor de 5 mg se ha considerado suficiente.

La exposición al cobre por fuentes tales como el agua puede ser, frecuentemente, superior a 1 mg/día y puede llegar a 4 mg en Escandinavia (VKM, 2007). Al ser este valor inferior a la TDI, se toma la diferencia hasta la TDI como propuesta una concentración de partida para la discusión del límite máximo de migración de cobre desde materiales cerámicos: 1 mg/kg de alimento.

3.5.2 Valoración de la propuesta

Los criterios utilizados para realizar la propuesta son aceptables. Se aplica el primer criterio mencionado en el apartado 2 (ingesta<TDI) y, por lo tanto, la propuesta de concentración es la diferencia entre la TDI y la ingesta.

3.6 Manganeso

3.6.1 Propuesta

La OMS ha considerado que un nivel de, aproximadamente, 4 mg es seguro (OMS, 2008).

De acuerdo con la OMS (2008), la ingesta diaria de manganeso es de alrededor de 11 mg. A falta de otros datos toxicológicos, la OMS asumió el valor de 4 mg como TDI basándose en esta ingesta y un factor de seguridad de 3.

Dado que la exposición es más de dos veces la TDI y aplicando el criterio mencionado en el apartado 2 para proponer una concentración de partida para la discusión del límite máximo de migración de manganeso desde materiales cerámicos, esta quedaría fijada en un 5% de la exposición: 550 µg/kg de alimento.

3.6.2 Valoración de la propuesta

La aplicación del tercer criterio, inicialmente mencionado en el apartado 2, resulta en un valor de 550 µg/kg de alimento (5% de la exposición y no supera la TDI). Sin embargo, se considera más adecuado utilizar el criterio alternativo referido en el apartado 3.1 y que, en este caso, implica asumir como máximo el 10% de la TDI (400 µg/día). Por tanto, con ese criterio, se obtendría un valor de partida para la discusión de 400 µg/kg de alimento.

3.7 Mercurio

3.7.1 Propuesta

EFSA (2004) asume la ingesta semanal tolerable provisional (*provisional tolerable weekly intake,* PTWI) de mercurio de 1,6 µg por kg de peso corporal y semana, propuesta por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, 2003). Esto se traduce, en una persona de 60 kg, en una TWI de 96 µg.

La exposición al mercurio a través de distintas fuentes, incluyendo los alimentos, es de 1,5 µg por kg de peso corporal (EFSA, 2004). Dado que esta exposición es similar a la PTWI y aplicando el criterio mencionado en el apartado 2 para proponer una concentración de partida para la discusión del límite máximo de migración de mercurio desde materiales cerámicos, esta quedaría fijada en un 10% de la TWI: 9,6 µg/kg de alimento.

3.7.2 Valoración de la propuesta

Los criterios utilizados para realizar la propuesta son aceptables.

3.8 Níquel

3.8.1 Propuesta

La OMS ha propuesto una TDI de níquel de 12 µg por kg de peso corporal derivada de un LOAEL *(lowest observed adverse effect level)* (OMS, 2008) y EFSA no ha establecido un valor de referencia (EFSA, 2005). La propuesta de la OMS se traduce, en una persona de 60 kg, en una TDI de 720 µg.

La exposición al níquel a través de distintas fuentes, incluyendo los alimentos, es de 2.500 µg por día en el peor de los casos, aunque normalmente la exposición está cerca de la TDI o por debajo

(VKM, 2007). Dado que la exposición es más de dos veces la TDI y aplicando el criterio mencionado en el apartado 2 para proponer una concentración de partida para la discusión del límite máximo de migración de níquel desde materiales cerámicos, esta quedaría fijada en un 5% de la exposición: 125 µg/kg de alimento.

3.8.2 Valoración de la propuesta

Teniendo en cuenta que la ingesta diaria no se conoce con exactitud y puede variar mucho, parece más razonable utilizar el criterio alternativo referido en el apartado 3.1 y asumir como máximo el 10% de la TDI (72 µg/día), obteniéndose una concentración de partida para la discusión de 72 µg/kg de alimento.

3.9 Plomo

3.9.1 Propuesta

EFSA ha considerado que no se puede establecer una ingesta semanal tolerable para el plomo pero se ha calculado una $BMDL_{01}$ de plomo cuyo menor valor es de 0,5 µg por kg de peso corporal y día (EFSA, 2010). Esto significa que un 1% de la población podría verse afectada adversamente por este nivel. Dado que no se cuenta con un NOAEL *(no observable adverse effect level)* y que se considera que el $BMDL_{01}$ es suficientemente conservador, se toma un valor de 30 µg diarios para una persona de 60 kg como sustituto de la TDI.

La exposición al plomo a través de los alimentos es de hasta 2,43 µg por kg de peso corporal y día (146 µg por día en una persona de 60 kg) (EFSA, 2010). Dado que esta exposición es más de dos veces el $BMDL_{01}$ y aplicando el criterio mencionado en el apartado 2 para proponer una concentración de partida para la discusión del límite máximo de migración de plomo desde materiales cerámicos, esta debería quedar fijada en un 5% de la exposición: 7,3 µg/kg de alimento. Sin embargo, teniendo en cuenta que el límite establecido para agua envasada es de 10 µg/l (a partir de 2014) (UE, 1998) y que la ingesta de agua envasada es mucho mayor que la de alimentos en contacto con cerámica, se propone este limite de 10 µg/kg de alimento.

3.9.2 Valoración de la propuesta

Los criterios utilizados para realizar la propuesta son aceptables.

3.10 Selenio

3.10.1 Propuesta

La OMS ha propuesto un NOAEL de selenio de 4 µg por kg de peso corporal y día (OMS, 2008). Con este NOAEL puede obtenerse una TDI de 240 µg en una persona de 60 kg sin aplicar un factor de seguridad, dado que el NOAEL se observó en humanos y que la OMS no lo utiliza.

Dado que la exposición al selenio desde otras fuentes es frecuente, se propone una concentración de partida para la discusión del límite máximo de migración de selenio desde materiales cerámicos de un 10% de la TDI: 24 µg/kg de alimento.

3.10.2 Valoración de la propuesta

Los criterios utilizados para realizar la propuesta son aceptables.

3.11 Talio

3.11.1 Propuesta

La *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) ha especificado una RfD *(reference dose)* de 0,00007 mg por kg de peso corporal y día (EPA, 2003). La propuesta de la EPA se traduce, en una persona de 60 kg, en una RfD de 0,004 mg por día. La RfD se obtiene a partir de un NOAEL de 0,20 mg por kg de peso corporal y día obtenido en un estudio subcrónico en ratas y aplicando un factor de incertidumbre de 3.000 (10 para extrapolar los datos de un estudio subcrónico a uno crónico, 10 para tener en cuenta la variabilidad entre especies, 10 para tener en cuenta la variabilidad interespecies y 3 para tener en cuenta la falta de datos en lo que respecta a la toxicidad crónica y reproductiva).

Dado que la RfD deriva de un NOAEL, la concentración de partida para la discusión del límite máximo de migración de talio desde materiales cerámicos, quedaría fijada en un 10% de la RfD: 0,4 µg/kg de alimento.

3.11.2 Valoración de la propuesta

Los criterios utilizados para realizar la propuesta son aceptables.

3.12 Métodos de control y consideración final

Actualmente existen métodos con suficiente sensibilidad para detectar las concentraciones de partida propuestas para la discusión del límite máximo de migración. La valoración de las propuestas se ha realizado únicamente respecto a si los criterios utilizados en su elaboración eran adecuados, teniendo en cuenta que estas concentraciones no son una propuesta de límites máximos en si misma sino un punto de partida para su discusión y sin descartar que puedan existir otros posibles sistemas de estimación que también sean aceptables. Las cifras resultantes de la aplicación de estos criterios no se deben entender como una propuesta de límites máximos de migración desde materiales cerámicos, sino como un punto de partida para su discusión, en la que se pueden tener en cuenta otros factores y criterios específicos de cada elemento.

Referencias

EFSA (2004). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food. *The EFSA Journal,* 34, pp: 1-14.

EFSA (2005). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Nickel. *The EFSA Journal,* 146, pp: 1-21.

EFSA (2009a). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Arsenic in Food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *The EFSA Journal,* 7 (10), pp: 1.351.

EFSA (2009b). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Cadmium in Food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *The EFSA Journal,* 980, pp: 1-139.

EFSA (2010). European Food Safety Authority Scientific Opinion on Lead in Food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *The EFSA Journal,* 8 (4), pp: 1.570.

EFSA (2011). European Food Safety Authority. Statement on tolerable weekly intake for cadmium. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *The EFSA Journal*, 9 (2), pp: 1.975.

EFSA (2012) European Food Safety Authority. Cadmium dietary exposure in the European population. *The EFSA Journal*, 10 (1), pp: 2.551.

EPA (2003). U.S. Environmental Protection Agency. Thallium (I) soluble salts; CASRN various. Disponible en: http://www.epa.gov/iris/subst/1012.htm [acceso: 28-3-12].

IOM (2001) Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. A report of the Panel on Micronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Washington, DC, National Academy Press. Disponible en: http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309072794 [acceso: 21-3-12].

JECFA (2003). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Methylmercury. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. WHO Technical Report Series No 922.

OMS (2003).Organización Mundial de la Salud. Copper in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/copper.pdf [acceso: 21-3-12].

OMS (2008).Organización Mundial de la Salud. Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating 1st and 2nd addenda, Vol.1, Recommendations. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf [acceso: 14-3-12].

Real Decreto 891/2006, de 21 de julio, por el que se aprueban las normas técnico-sanitarias aplicables a los objetos de cerámica para uso alimentario. BOE 174 de 22 de julio de 2006, pp: 27615-27617.

Real Decreto 1631/2011, de 14 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 891/2006, de 21 de julio, por el que se aprueban las normas técnico-sanitarias aplicables a los objetos de cerámica para uso alimentario. BOE 284 de 25 de noviembre de 2011, pp: 125533-125534.

RIVM (2001). Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. Reevaluation of human toxicological maximum permissible risk levels. RIVM Report 711701 025. Disponible en: http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/711701025.pdf [acceso: 14-3-12].

SCF (2003). Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Copper. SCF/CS/NUT/UPPLEV/57 Final. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out176_en.pdf [acceso: 21-3-12.

UE (1984). Directiva 84/500/CEE. Directiva del Consejo, de 15 de octubre de 1984, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre objetos de cerámica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DO L 277/12 de 15 de octubre de 1984, pp: 6-10.

UE (1998). Directiva 98/83/CE del Consejo, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. DO L 330 de 5 de diciembre de 1998, pp: 0032-0054.

UE (2004). Reglamento (CE) Nº 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE. DO L 338 de 27 de octubre de 2004, pp: 4-17.

VKM (2007). Norwegian Scientific Committee for Food Safety. Risk assessment of health hazards from nickel, cobalt, zinc, iron, copper and manganese migrated from ceramic articles. Disponible en: http://vkm.no/dav/ebc8d55983.pdf [acceso: 26-3-12].

Vermeire, T.G., van Apeldoo, M.E., de Fouw, J.C. y Janssen, P.J.C.M. (1991). Voorstel voor de humaan-toxicologische onderbouwing van C-(toetsings) waarden. Rapportnr. 725201005.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) con relación a las medidas de control para reducir la presencia de *Campylobacter* spp. en carne fresca de aves (pollo)

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, María Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, Mª 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, Mª Carmen Vidal Carou

Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2012-005

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 19 de septiembre de 2012

Grupo de Trabajo

Mª Rosario Martín de Santos (Coordinadora)
Alberto Cepeda Sáez
Antonio Herrera Marteache
Antonio Martínez López

Resumen

La campilobacteriosis es una enfermedad de transmisión alimentaria que el hombre padece principalmente por la manipulación y consumo de carne de pollo contaminada con diferentes especies de *Campylobacter*. No obstante, la infección también se puede contraer por contacto con animales portadores y a través de la exposición ambiental.

El principal reservorio de *Campylobacter* spp. son las aves, además del ganado bovino, ovino, porcino, roedores, perros y gatos, así como mamíferos y aves silvestres. El espectro de reservorios varía con la especie: *C. jejuni* se encuentra muy difundido, mientras *C. coli* se aísla más frecuentemente de los cerdos. La adquisición primaria de *Campylobacter* spp. por los animales acontece tras el nacimiento y aunque puede ser causa de morbimortalidad en estos animales, en la mayoría de las ocasiones la colonización conduce a un estado permanente de portador.

El último informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sobre zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de toxiinfecciones alimentarias registrados en 2010, muestra que *Campylobacter* spp. sigue siendo el patógeno de transmisión alimentaria responsable del mayor número de casos (212.064). En la Unión Europea (UE), la tasa de notificación pasó de 45,6 casos por 100.000 habitantes en 2009 a 48,6 en 2010. Conviene resaltar que la tasa de notificación de casos confirmados de campilobacteriosis ha mostrado una tendencia creciente en los últimos cinco años (2006-2010), especialmente desde 2008.

La campilobacteriosis cursa con enterocolitis aguda que se manifiesta con malestar, fiebre, dolores abdominales severos y diarrea acuosa o sanguinolenta. El periodo de incubación oscila entre 1 y 11 días (normalmente de 1-3 días). En la mayoría de los casos la diarrea tiende a remitir por sí misma. Las bacteriemias ocurren en <1% de los pacientes con enteritis, pudiéndose producir también secuelas que cursan como desórdenes reumatoides o neuropatías periféricas (síndrome de Guillain-Barré).

Las estrategias para el control de *Campylobacter* spp. en la carne de pollo tienen que estar basadas en la estricta aplicación de las Buenas Prácticas Higiénicas (GHP) y del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) en toda la cadena alimentaria.

Palabras clave

Campylobacter spp., carne de pollo, síndrome Guillain-Barré, descontaminación.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the control strategies to reduce the burden of *Campylobacter* spp. in fresh poultry meat (broiler).

Abstract

Campylobacteriosis is a foodborne disease that affects humans mainly due to manipulation and consumption of broiler meat contaminated with different species of *Campylobacter*. Nevertheless the infection can also be acquired through contact with carriers and environmental exposure.

The main reservoir for *Campylobacter* spp. are birds, along with cattle, sheep, pigs, rodents, cats and dogs and wild mammals and birds. The reservoir spectrum varies according to the species: *C. jejuni* is widely spread whilst *C. coli* is more frequently isolated from pigs. Primary acquisition of *Campylobacter* spp. from animals occurs after birth and although it can be a cause of morbi-mortality in these animals, in most cases colonization leads to a state of permanent carrier.

The last European Food Safety Authority (EFSA) report on zoonosis, zoonotic agents and foodborne outbreaks registered in 2010 shows that *Campylobacter* spp. is still the foodborne pathogen responsible for the largest number of cases (212,064). In the European Union (EU), the notification rate increased from 45.6 per 100,000 in 2009 to 48.6 per 100,000 in 2010. Remarkably the notification rate of confirmed campylobacteriosis has shown a growing trend in the last five years (2006-2010), especially since 2008.

Campylobacteriosis causes acute enterocolitis with discomfort, fever, severe abdominal pain and aqueous and/or bloody diarrhea. The incubation period varies from 1 to 11 days (usually 1-3 days). In most cases, the diarrhea is self-limiting. Bacteriemias occur in less than 1% of the patients with enteritis and provoke after-effects like rheumatoid disorders or peripheral neuropathies (Guillain-Barré syndrome).

Control strategies to reduce the burden of *Campylobacter* spp. in broiler meat must be based on the strict implementation of Good Hygiene Practices (GHP) and the Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system along the whole food chain.

Key words

Campylobacter spp., broiler meat, Guillain-Barré syndrome, decontamination.

Introducción

La elevada incidencia de la campilobacteriosis en la población, principalmente por la manipulación y consumo de carne de pollo poco cocinada, 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 con relación a las medidas de control que permitan reducir la presencia de *Campylobacter* spp. en la carne fresca de aves de corral (pollo).

Los microorganismos identificados como *Campylobacter* spp. se encuentran ampliamente difundidos en la naturaleza, aunque su reservorio más común es el tracto intestinal de los mamíferos y aves, tanto domésticos como salvajes. Los animales portadores raramente manifiestan la enfermedad. *Campylobacter* spp. contamina fácilmente los alimentos, incluyendo la carne y derivados cárnicos, leche y derivados lácteos, pescado y productos de la pesca, así como agua, frutas y hortalizas. No obstante, la manipulación y consumo de carne de aves, así como de leche y derivados lácteos no pasteurizados y de aguas contaminadas, constituyen el origen más común de adquisición de *Campylobacter* spp. por las personas. La elevada incidencia de infecciones entéricas por *Campylobacter* spp. y la posible existencia de secuelas aconseja el desarrollo de metodologías de prevención y control de su presencia en los alimentos (Rosenquist et al., 2003, 2006) (ELIKA, 2006).

En la Unión Europea, se estima que se producen anualmente entre 2 y 20 millones de casos de infecciones por *Campylobacter* spp. (EFSA, 2010). A nivel mundial se considera que se registran entre 400 y 500 millones de casos (Ganan et al., 2012). Las especies más comúnmente asociadas con la infección humana son *C. jejuni* seguido por *C. coli* y *C. lari*. Estas bacterias se encuentran ampliamente difundidas en la naturaleza, aunque su reservorio más común es el tracto intestinal de las aves y mamíferos. Estudios realizados en Inglaterra, Escocia y Nueva Zelanda utilizando la técnica de tipado mediante secuenciación multilocus (MLST) han identificado a la carne de pollo como la principal fuente de transmisión de *Campylobacter* spp. al hombre (50-80% de los casos), mostrando que los genotipos más aislados en el hombre son también los más aislados del pollo (Strachan y Forbes, 2010).

En el hombre, el período de incubación de la campilobacteriosis puede oscilar entre 1 y 11 días. Los síntomas incluyen diarrea acuosa que a veces puede ser sanguinolenta, dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza y náuseas. Por lo general, las infecciones son autolimitadas y solo duran unos días. Las complicaciones se atribuyen a su dispersión gastrointestinal. Las bacteriemias ocurren en <1% de los pacientes con enteritis, pudiéndose producir también secuelas que cursan como desórdenes reumatoides o neuropatías periféricas.

Las estrategias para el control de *Campylobacter* spp. en la carne de pollo tienen que basarse en la estricta aplicación de las Buenas Prácticas Higiénicas y del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) en toda la cadena alimentaria.

Evaluación del riesgo

El género *Campylobacter* se considera responsable de infecciones entéricas humanas (Friedman et al., 2000) (Doyle y Erickson, 2006), por lo que constituye un importante problema de salud pública. En la mayoría de los países industrializados, las infecciones por *Campylobacter* spp. son más frecuentes que las debidas a *Salmonella* spp., *Shigella* spp., o *E. coli* O157:H7.

1. Identificación del peligro

El género *Campylobacter* comprende 23 especies y este número se va incrementando debido a la identificación de nuevas especies. La mayoría de las infecciones humanas son ocasionadas por *C. jejuni* (80%) y, en menor grado, por *C. coli* (10%). *C. jejuni* incluye dos subespecies (*C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. jejuni* subsp. *doylei*). La enfermedad en el hombre se presenta en forma de casos esporádicos, siendo menos frecuente la existencia de brotes. Otras especies como *C. upsaliensis*, *C. lari* y *C. fetus* también se han asociado con diarrea en el hombre.

Los microorganismos del género *Campylobacter* son bacilos Gram negativos, curvados o de forma espiral, móviles mediante un flagelo unipolar o bipolar y microaerofílicos. Los *Campylobacter* spp. termofílicos (desarrollo óptimo a 42-43 ºC), entre los que se incluyen *C. jejuni*, *C. coli, C. lari, C. upsaliensis* y *C. helveticus*, se consideran el origen más frecuente de gastroenteritis en el hombre.

Las especies del género *Campylobacter* son sensibles a factores como la baja actividad de agua, calor, radiación ultravioleta, sal, etc. A diferencia de otros patógenos alimentarios como *Salmonella* spp., no se multiplican en los alimentos. No obstante, pueden sobrevivir en el medio externo si se evita la desecación, que es uno de los factores más estresantes para esta bacteria. Muchas aguas superficiales están contaminadas con excretas animales que contienen *Campylobacter* spp. En lodos y en aguas estancadas pueden sobrevivir hasta tres meses (Nicholson et al., 2005).

Las especies del género *Campylobacter* se encuentran como comensales en el tracto gastrointestinal de animales domésticos y salvajes. El principal reservorio de *Campylobacter* spp. son las aves (pollos, gallinas ponedoras, patos, pavos, ocas, codornices, avestruces, etc.) (Wassenaar y Blaser, 1999) (Newel y Wagenaar, 2000) (Waldenstrom et al., 2002). Otros reservorios son el ganado bovino, ovino, porcino, roedores, perros y gatos así como mamíferos y aves silvestres. El espectro de reservorios varía con la especie: *C. jejuni* se encuentra muy difundido, mientras *C. coli* se aísla más frecuentemente de los cerdos. La adquisición primaria de *Campylobacter* spp. por los animales ocurre generalmente pronto tras el nacimiento y aunque puede ser causa de morbimortalidad en estos animales, la mayoría de las veces la colonización conduce a un estado permanente de portador.

El amplio espectro de reservorios animales es probablemente la fuente de la mayoría de las infecciones humanas. La vía de infección más frecuente es el consumo de carne procedente de animales portadores así como de leche no pasteurizada. Otra vía menos habitual es el contacto con animales infectados, ya sea con animales domésticos o como accidente ocupacional en personas expuestas al ganado. Muchos serotipos humanos se han identificado también en animales.

Campylobacter spp. puede sobrevivir en el agua durante semanas y persistir en aguas estancadas y residuales procedentes de fuentes diversas, como las provenientes de mataderos, plantas de tratamiento de aguas residuales con la posibilidad de llegar a las aguas superficiales, pantanos y agua de consumo. Por ello, los fallos en las plantas de tratamiento, el empleo de agua no tratada por cloración o tratamientos equivalentes, o la procedente de pozos puede ser la vía por la que el microorganismo llegue a los animales y al hombre. De hecho, el consumo de agua contaminada ha sido responsable de algunos brotes de campilobacteriosis, que también pueden aparecer vinculados a actividades recreativas como el baño en aguas contaminadas. La contaminación fecal del suelo es también el origen de infecciones humanas, principalmente por el consumo de vegetales cultivados en terrenos contaminados o regados con aguas fecales.

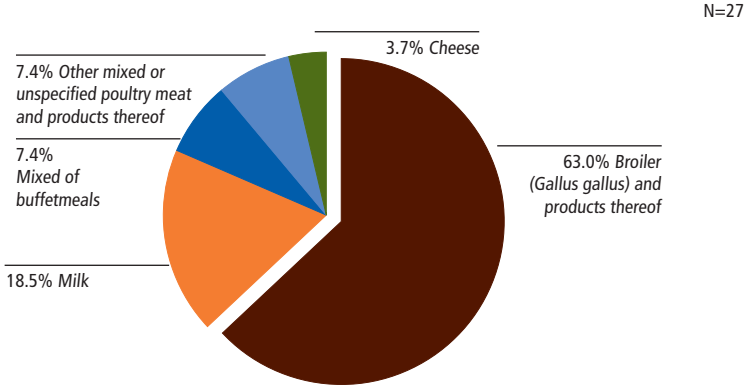
Los insectos, como las moscas, por su contacto con material fecal actúan como transmisores de *Campylobacter* spp. al interior de las explotaciones animales, pudiendo contaminar diversas fuentes.

En países industrializados, *Campylobacter* spp. se transmite a las personas principalmente a través del consumo de alimentos de origen animal (en especial la carne de pollo poco cocinada), mientras que en los países en vías de desarrollo predomina la transmisión por alimentos y aguas contaminadas con excretas, así como por contacto directo con animales o personas enfermas.

Como sucede con otras infecciones entéricas, la vía de transmisión fecal-oral entre individuos infectados es posible, en especial, entre niños que habitan en ambientes con deficientes condiciones higiénicas. La transmisión a partir de personas infectadas asintomáticas que manipulan los alimentos es rara, pero es mayor cuando la infección es sintomática, lo que justifica la exclusión de los manipuladores del entorno laboral mientras se encuentren afectados.

El informe de EFSA (2012) recoge los principales alimentos implicados en los brotes atribuidos a *Campylobacter* spp. Como se muestra en la Figura 1, un 63% se atribuyeron al consumo de carne de pollo, un 18,5% a la ingestión de leche no pasteurizada, un 7,4% a comidas preparadas listas para consumir, otro 7,4% a carnes procedentes de otras especies animales diferentes del pollo y un 3,7% al queso.

Figure OUT17. Distribution of food vehicles in strong evidence Campylobacter outbreaks in the EU, 2010

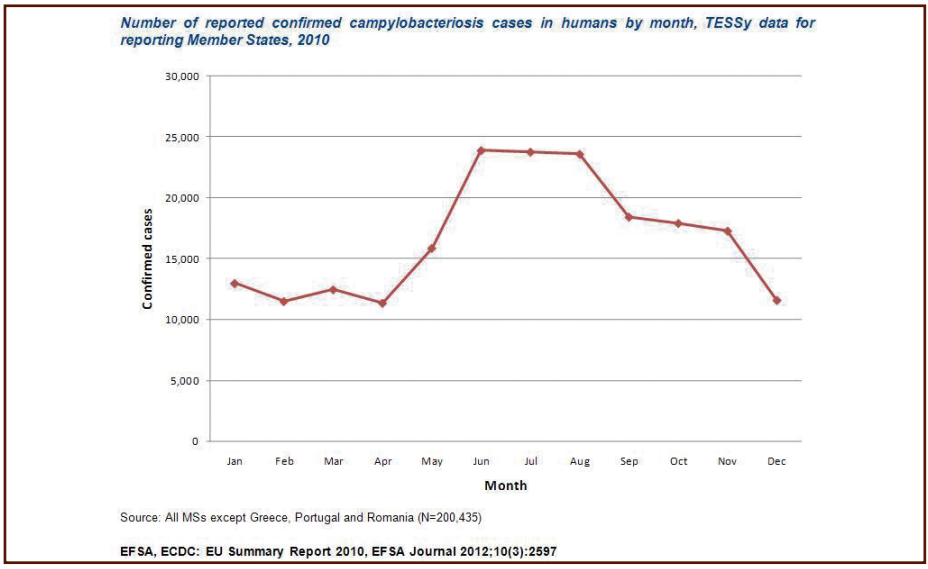


Note: Data from 27 outbreaks are included: Denmark (2), Finland (1), Germany (3), Ireland (1), Netherlands (2), Slovakia (2) and United Kingdom (16).

Figura 1. Principales alimentos responsables de los brotes de campilobacteriosis humana en la Unión Europea (año 2010). **Fuente:** (EFSA, 2012).

La asociación entre el consumo de carne de pollo y la campilobacteriosis humana queda reflejada en dos crisis alimentarias que han tenido a esta especie animal como protagonista. En 1999, en Bélgica, la detección de elevadas concentraciones de dioxinas en los piensos destinados a granjas de pollos provocó la retirada del mercado de la carne y huevos procedentes de esta especie animal, comprobándose de forma coincidente una reducción de un 40% de los casos humanos de campilobacteriosis. En mayo de 2003, en Holanda, como consecuencia de un brote de influenza aviar, se sacrificaron un elevado número de pollos de diferentes explotaciones avícolas, lo que contribuyó también a una reducción de más de un 40% de los casos de campilobacteriosis (EFSA, 2010).

En todo el mundo, el número de casos de campilobacteriosis aumenta en verano y principios del otoño, coincidiendo con el aumento de la temperatura ambiental (Figura 2). La mayoría de *Campylobacter* spp. son sensibles a condiciones ambientales que hacen inviable su supervivencia durante mucho tiempo fuera del hospedador (Nachamkin, 1997). Los factores que dificultan su multiplicación en los alimentos son: 1) el pH ácido y la desecación, 2) al ser microaerofílicos, la tensión de oxígeno en el aire les inactiva, 3) su desarrollo a temperaturas inferiores a 30 ºC es mínimo, e incluso nulo (para que se multipliquen son necesarias temperaturas comprendidas entre 42 y 45 ºC), y 4) son sensibles a la mayoría de los desinfectantes conocidos. La congelación ha demostrado ser un buen sistema de control de *Campylobacter* spp. No obstante, es un hecho demostrado que algunas cepas pueden sobrevivir durante meses.



Nota: Los datos de humanos se recogen en el Centro Europeo de Control de Enfermedades (ECDC) a través del Sistema Europeo de Vigilancia (TESSy). TESSy es una plataforma informática en uso desde abril de 2008 y que recoge datos de 49 enfermedades infecciosas.

Figura 2. Evolución mensual del número de casos confirmados de campilobacteriosis humana en la Unión Europea (año 2010). **Fuente:** (EFSA, 2012).

2. Caracterización del peligro

La campilobacteriosis en el ser humano cursa con enterocolitis aguda que se manifiesta con malestar, fiebre, dolores abdominales severos y diarrea acuosa o sanguinolenta. El periodo de incubación oscila entre 1 y 11 días (normalmente de 1-3 días). En la mayoría de los casos la diarrea tiende a remitir por sí misma. Complicaciones derivadas de las infecciones por *Campylobacter* spp. se atribuyen a su dispersión gastrointestinal e incluyen colecistitis, pancreatitis, peritonitis y hemorragias gastrointestinales (Van Vlirt y Ketley, 2001). Las bacteriemias ocurren en <1% de los pacientes con enteritis por *Campylobacter* spp. No obstante, su capacidad invasiva es inferior a la de otros patógenos entéricos. La mortalidad debida a las infecciones por *Campylobacter* spp. es de 0,05 personas por cada 1.000 afectados.

C. jejuni y *C. coli* se reconocen como las especies responsables de la mayoría de las infecciones gastrointestinales, con síntomas difícilmente distinguibles para ambas entidades. *C. upsaliensis, C. hyointestinalis, C. concisus* y *C. lari* también se han asociado a infecciones gastrointestinales humanas. Diversos biovares de *C. sputorum* y *C. fetus* se han vinculado también a infecciones extraintestinales, mientras *C. mucosalis* se ha aislado de pacientes con enteritis. *C. rectus, C. showae* y *C. gracilis* se han aislado también de infecciones periodontales (Nachamkin, 1997). En los casos severos de la enfermedad, el tratamiento de elección es la eritromicina, aunque también pueden utilizarse fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina y norfloxacina.

Los individuos expuestos y colonizados con *Campylobacter* spp. desarrollan una respuesta inmune humoral y celular, que pueden conferir protección en exposiciones sucesivas. En países desarrollados, la mayoría de las infecciones son asintomáticas. En el Reino Unido y en Holanda, sólo 1 de cada 100 infecciones cursa con síntomas (EFSA, 2011).

No obstante, conviene resaltar que las infecciones por *Campylobacter* spp. originan, a veces, secuelas no-gastrointestinales, infrecuentes pero severas (Smiyh, 1995). Dichas infecciones son: 1) artritis reactiva, un proceso no infeccioso que afecta a múltiples articulaciones y asociada al fenotipo HLA-B27, 2) el síndrome de Guillain-Barré (GBS), un desorden desmielinizante del sistema nervioso con debilidad, normalmente simétrica de los párpados y músculos respiratorios, con pérdida de reflejos y que puede convertirse en crónico o mortal y 3), el síndrome de Miller Fisher (MFS), una variante del GBS caracterizado por oftalmoplegia, ataxia y areflexia (Hadden y Gregson, 2001) (Nachamkin, 2002) (Schwerer, 2002) (Takahashi et al., 2005).

Un análisis de la bibliografía existente pone de manifiesto que de un 20-50% de los casos de GBS, tienen su origen en una infección previa por *Campylobacter* spp. y la incidencia de GBS en la población oscila del 0,6 al 1,9% (EFSA, 2010). En un estudio realizado en Nueva Zelanda (Baker et al., 2012) donde se analizaron los casos de campilobacteriosis y de GBS en el periodo 1988-2010, se comprobó que las hospitalizaciones por GBS estaban correlacionadas con las notificaciones de campilobacteriosis. En los pacientes hospitalizados por campilobacteriosis, el riesgo de ser hospitalizado de nuevo por el síndrome de GBS en los siguientes 30 días se incrementaba notablemente. En este trabajo se comprobó que tras las intervenciones dirigidas a disminuir la contaminación de la carne de pollo con *Campylobacter* spp., las notificaciones de casos de campilobacteriosis habían disminuido en un 52% y las hospitalizaciones por GBS en un 13%. Por ello se considera que las medidas de control para reducir la campilobacteriosis tienen un efecto adicional en la disminución de casos de GBS.

También se ha puesto de manifiesto que un 9% de los afectados por un cuadro de enteritis desarrollan con posterioridad a la infección un síndrome de colon irritable (IBS). En Holanda, con unos 80.000 casos de campilobacteriosis por año, el coste de las secuelas excluyendo el síndrome IBS, se estiman en 21 millones de euros por año. En Bélgica con 55.000 casos el coste asciende a 27 millones (EFSA, 2010).

El informe de EFSA (2006) señala que una proporción relativamente elevada de cepas de *Campylobacter* spp. procedentes de animales y de alimentos resultaron ser resistentes a los antibióticos que se utilizan habitualmente en el tratamiento de enfermedades humanas. Esto es así, especialmente, en el caso de la resistencia a las fluoroquinonas que presentan las cepas de *Campylobacter* spp. procedentes de aves de corral, de las cuales hasta un 94% fueron resistentes al ciprofloxacino.

A pesar del papel de *Campylobacter* spp. como responsable de infecciones humanas, todavía existen incertidumbres acerca de los mecanismos biológicos de su actividad patógena (Haddad, 2010) (Silva et al., 2012). No obstante, se sabe que los distintos aislados de *C. jejuni* son extraordinariamente diversos, fenotípica y genéticamente, lo que condiciona las características de sus factores potenciales de virulencia. Posiblemente dichas diferencias radiquen en la plasticidad de su genoma, derivado de la observación de que el orden, localización y presencia de genes es diferente en los distintos aislados evaluados (Parkhill et al., 2000) (Fouts et al., 2005) (ELIKA, 2006) (Hofreuter et al., 2006).

Entre los factores de virulencia asociados a *Campylobacter* spp. parece que los flagelos polares juegan un papel activo en su movilidad por el tracto intestinal, adherencia, invasión de las células epiteliales humanas, e inmunidad. Otro de los mecanismos de virulencia puede ser la producción de toxinas, enterotoxinas y citotoxinas, de las que se reconocen hasta seis y de las que solamente el gen responsable de la síntesis de una de ellas *(cdt)* se ha localizado en su genoma. También se conoce que *Campylobacter* spp. invade las células epiteliales humanas mediante fenómenos de adhesión e invasión celular lo que origina lesiones celulares, pérdida de funcionalidad y diarrea (Hernández, 2010). Asimismo, como ocurre con otras bacterias Gram negativas, el lípido A de los lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular de *C. jejuni* posee actividad endotóxica por lo que una infección sistémica puede originar sepsis y *shock*, presumiblemente por la liberación de LPS. *C. jejuni* manifiesta una estructura antigénica diversa derivada de sus componentes lipopolisacáridos (LPS) o lipooligosacáridos (LOS). El interés en el papel de los LPS/LOS en la patogenicidad de *C. jejuni* resulta del reconocimiento de que dichas estructuras manifiestan homología con la de los gangliósidos neuronales, lo que puede contribuir al desarrollo del síndrome de Guillain-Barré (Duim et al., 2000). *C. jejuni* posee, asimismo, dos plásmidos (pVir y pTet) posiblemente implicados en su virulencia.

La distribución por edad de las infecciones por *Campylobacter* spp. es similar a otros patógenos entéricos humanos (EFSA, 2007). En países industrializados, se han detectado dos picos de actividad: en niños <4 años de edad y en jóvenes con edades comprendidas entre 15 y 24 años (Figura 3). Existe una evidencia cada vez mayor de que la inmunidad adquirida como consecuencia de exposiciones sucesivas a *Campylobacter* spp., podría ejercer un importante papel en la protección frente a la enfermedad (Cawthraw et al., 2000).

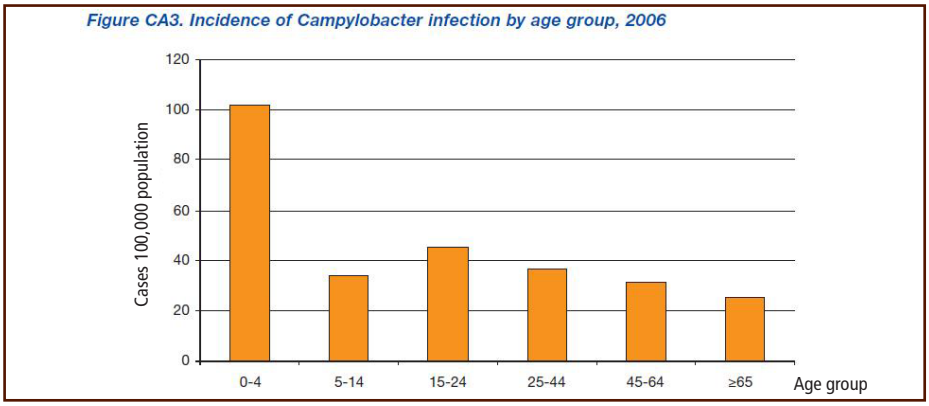


Figura 3. Incidencia en la Unión Europea de la campilobacteriosis humana en función del grupo de edad considerado (año 2006). **Fuente:** (EFSA, 2007).

Las especies del género *Campylobacter* son sensibles al pH bajo y, por ello, las condiciones del tracto gastrointestinal deberían ser suficientes para eliminar o reducir a la mayoría de cepas de *C. jejuni* que lo atraviesan (Allos, 2001). Sin embargo, resulta paradójico que dosis infectivas inferiores a 1.000 células de *C. jejuni* sean capaces de iniciar la enfermedad (Haddad et al., 2010).

El último informe de EFSA (2012) sobre zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de toxiinfecciones alimentarias registrados en 2010 muestra que *Campylobacter* spp. sigue siendo el patógeno de transmisión alimentaria responsable del mayor número de casos (212.064) (Figura 4).

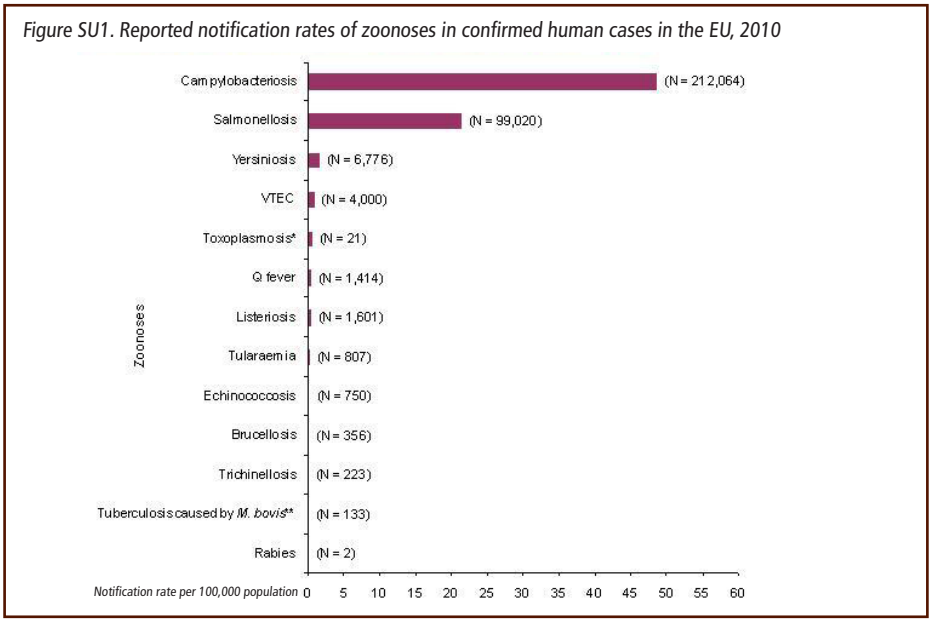


Figura 4. Notificaciones de casos humanos producidos por distintos agentes zoonóticos en la Unión Europea (2010). **Fuente:** (EFSA, 2012).

En la Unión Europea, el número de casos confirmados de campilobacteriosis humana aumentó en un 6,7% en 2010 respecto de 2009. En España se confirmaron 6.340 casos (Figura 5).

Figura 5. Número de casos de campilobacteriosis humana notificados por los distintos Estados miembros de la Unión Europea (año 2010). **Fuente:** (EFSA, 2012)

Reported campylobacteriosis cases in humans 2006-2010 and notification rates for 2010

		2010			2009	2008	2007	2006
Country	***Report type[1]***	***Cases***	***Confirmed***	***Confirmed cases/100,000***	***Confirmed cases***			
Austria	C	4,405	4,405	52.60	1,516	4,280	5,822	5,020
Belgium	C	3,031	3,031	27.96	5,697	5,111	5,895	5,771
Bulgaria	A	6	6	0.8	26	19	38	75
Cyprus	C	55	55	6.85	37	23	17	2
Czech Republic	C	21,164	21,075	200.58	20,259	20,067	24,137	22,571
Denmark	C	4,037	4,037	72.94	3,353	3,470	3,868	3,239
Estonia	C	197	197	14.70	170	154	114	124
Finland	C	3,944	3,944	73.70	4,050	4,453	4,107	3,439
France	C	4,324	4,324	6.68	3,956	3,424	3,058	2,675
Germany	C	65,713	65,110	79.59	62,787	64,731	66,107	52,035
Greece	-[4]	-	-	-	-	-	-	-
Hungary	C	7,201	7,201	71.91	6,579	5,516	5,809	6,807
Ireland	C	1,662	1,660	37.15	1,810	1,752	1,885	1,812
Italy	C	457	457	0.76	531	265	676	801
Latvia	C	1	1	0.04	0	0	0	0
Lithuania	C	1,095	1,095	32.89	812	762	564	624
Luxembourg	C	600	600	119.51	523	439	345	285
Malta	C	204	204	49.40	132	77	91	54
Netherlands[2]	C	4,322	3,983	46.21	3,739	3,341	3,289	3,186
Poland	C	375	367	0.96	359	270	192	157
Portugal	-[4]	-	-	-	-	-	-	-
Romania	C	179	175	0.82	254	2	-	-
Slovakia	C	4,578	4,476	82.51	3,813	3,064	3,380	2,718
Slovenia	C	1,022	1,022	49.93	952	898	1,127	944
Spain[3]	C	6,340	6,340	55.14	5,106	5,160	5,331	5,889
Sweden	C	8,001	8,001	85.66	7,178	7,692	7,106	6,078
United Kingdom	C	70,298	70,298	113.37	65,043	55,609	57,849	52,134
EU Total		**213,211**	**212,064**	**48.56**	**198,682**	**190,579**	**200,807**	**176,440**
Iceland	C	55	55	17.32	74	98	93	117
Liechtenstein	-	-	-	-	-	2	0	10
Norway	C	2,682	2,682	55.21	2,848	2,875	2,836	2,588
Switzerland[5]	C	6,604	6,604	85.05	7,795	7,552	5,834	5,240

[1] *A: aggregated data report; C: case-based report; no report.*

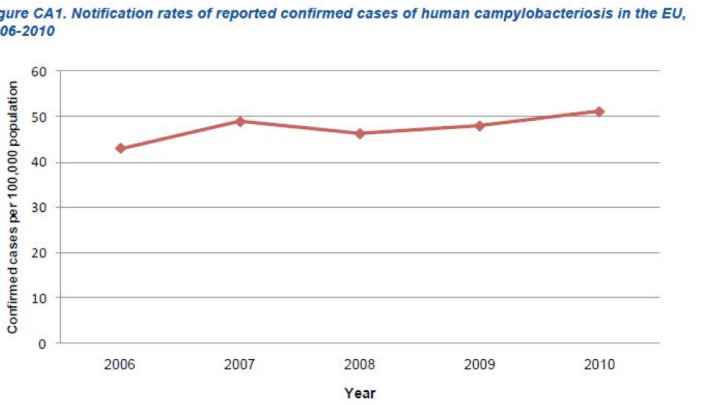
[2] *Sentinel system; notification rates calculated on estimated coverage of 52%.*

[3] *Surveillance system; notification rates calculated on estimated coverage of 25%.*

[4] *No surveillance system exists.*

[5] *Switzerland provided data directly to EFSA.*

En la UE, la tasa de notificación pasó de 45,6 casos por 100.000 habitantes en 2009 a 48,6 en 2010 (Figura 6).



Source (for EU trend): Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Hungary, Ireland, Italy, Latvia, Lithuana, Luxembourg, Malta, Netherlands, Poland, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, and United Kingdom.

Figura 6. Tasas de notificación correspondientes a la campilobacteriosis humana en la Unión Europea (años 2006-2010). **Fuente:** (EFSA, 2012).

El número de muertes confirmadas atribuidas a este patógeno fue de 266. Como en años anteriores, en los niños menores de 5 años se registró la mayor tasa de notificación (126,8 por 100.000 habitantes). En general, las tasas de notificación se incrementaron en todos los grupos de población, aunque la mortalidad fue relativamente baja (0,22%). Es importante señalar que la notificación de casos de campilobacteriosis es voluntaria en algunos países, entre los que se incluye España (Figura 7). Por ello, se estima que en Europa se producirían, cada año, entre 2 y 20 millones de casos clínicos de campilobacteriosis en el hombre (EFSA, 2010, 2011).

Figura 7. Registro de notificaciones en la Unión Europea de la presencia de *Campylobacter* spp. en el hombre, animales y alimentos. **Fuente:** (EFSA, 2012)

Notification on Campylobacter in humans (V=Voluntary, O=Other), animals and food, 2010			
Country	***Notifiable in humans since***	***Notifiable in animals since***	***Notifiable in food since***
Austria	1947	*no*	1975
Belgium	2000 V	1998	2004
Bulgaria	*yes*	-	-
Cyprus	2005	-	-
Czech Republic	*yes*	*no*	*yes*
Denmark	1979	*no*	*no*
Estonia	1988	2000	*yes*[1]
Finland	1995	2004[2]	*no*[3]
France	2002 V	-	-
Germany	*no*	*yes*[4]	*yes*
Greece	-	*no*	*no*
Hungary	1998	*no*	*no*
Ireland	2004	1992	*no*
Italy	1990 V	*no*	1962
Latvia	1999	*yes*	2004
Lithuania	1990	>30 *years*	-
Luxembourg	*yes*	*no*	-
Malta	*yes*	-	-
Netherlands	*yes* V	*yes*	*yes*
Poland	2004	-	-
Portugal	*no*	*no*	-
Romania	*yes*	*no*	-
Slovakia	1980's	*no*	2000
Slovenia	1987	*no*	2003
Spain	1989 V	1994	1994
Sweden	1989	*no*	*no*
United Kingdom	*no* 0	*no*	*no*
Iceland	*yes*	-	-
Liechtenstein	*yes*	-	-
Norway	1991	*yes*[5]	*yes*[5]
Switzerland	*yes*	1966	*no*

[1] *In Estonia, only C. jejuni.*

[2] *In Finland, Campylobacter notifiable in Gallus gallus only.*

[3] *In Finland, food business operator has to notify to the competent authority, but there is no central notification system.*

[4] *In Germany, Campylobacter is notifiable in cattle (veneric infection).*

[5] *In Norway, only positive samples from Gallus gallus detected in the national control programme.*

De acuerdo al informe de EFSA (2012), las especies de *Campylobacter* que se identificaron en 2010 fueron *C. jejuni* (35,7%), *C. coli* (2,3%), *C. lari* (0,22%) y *C. upsaliensis* (0,006%). En el año 2010, el 51,8% de los 212.063 casos atribuidos a *Campylobacter* spp. no se caracterizaron a nivel de especie.

La incidencia de brotes asociados al contacto directo bien con animales portadores, o mediante la ingestión de alimentos o aguas contaminadas no se conoce con precisión. No obstante, el informe de EFSA (2012) registra un total de 470 brotes, de los que sólo en 27 existe una fuerte evidencia de los alimentos implicados (Figura 8).

Figura 8. Brotes de campilobacteriosis humana en la Unión Europea (año 2010). **Fuente:** (EFSA, 2012)

Strong and weak evidence food-borne outbreaks caused by Campylobacter (excluding strong evidence waterborne ourbreaks), 2010

	Total Outbreaks		*Strong evidence outbreaks*				*Weak evidence outbreaks*			
		Reporting rate		*Human cases*				*Human cases*		
Country	*N*	*per 100,000*	*N*	*Cases*	*Hospitalised*	*Deaths*	*N*	*Cases*	*Hospitalised*	*Deaths*
Austria	82	0.98					82	185	27	0
Belgium	2	0.02					2	4	0	0
Czech Republic	3	0.03					3	26	0	0
Denmark	3	0.09	2	46	1	0	1	2	1	0
Estonia	6	0.45					6	13	0	0
Finland	3	0.06	1	3	0	0	2	10	4	0
France	20	0.03					20	168	9	0
Germany	149	0.18	3	42	0	0	146	381	24	0
Hungary	29	0.29					29	66	11	0
Ireland	1	0.02	1	5	1	0	0	0	0	0
Italy	6	0.01					6	12		
Lithuania	1	0.03					1	2	2	0
Malta	19	4.59					19	48		0
Netherlands	17	0.10	2	24	0	0	15	43	3	0
Poland	5	0.01					5	20	4	0
Slovakia	98	1.81	2	20	1	0	96	289	28	0
Spain	2	<0.01	0	0	0	0	2	5	0	0
Sweden	6	0.06					6	25	5	0
United Kingdom	18	0.03	16	258	7	0	2	92	4	0
EU Total	**470**	**0.10**	**27**	**398**	**10**	**0**	**443**	**1,391**	**122**	**0**
Norway	5	0.10					5	18	0	0
Switzerland	1	0.01					1	3	0	0

Al contrario de lo que ocurre con otras bacterias de transmisión alimentaria, la mayoría de los casos de campilobacteriosis son esporádicos, siendo relativamente poco frecuente la aparición de brotes afectando a numerosos individuos.

Con relación a las causas desencadenantes de los brotes, en 20 (74,1%) se atribuyeron a prácticas higiénicas inadecuadas en restaurantes, cafeterías y hoteles (Figura 9). La manipulación de la carne cruda de pollo y las contaminaciones cruzadas durante la preparación de los alimentos en el ámbito doméstico o de la restauración es un punto crítico de control en la disminución de la campilobacteriosis humana (Riedel et al., 2009).

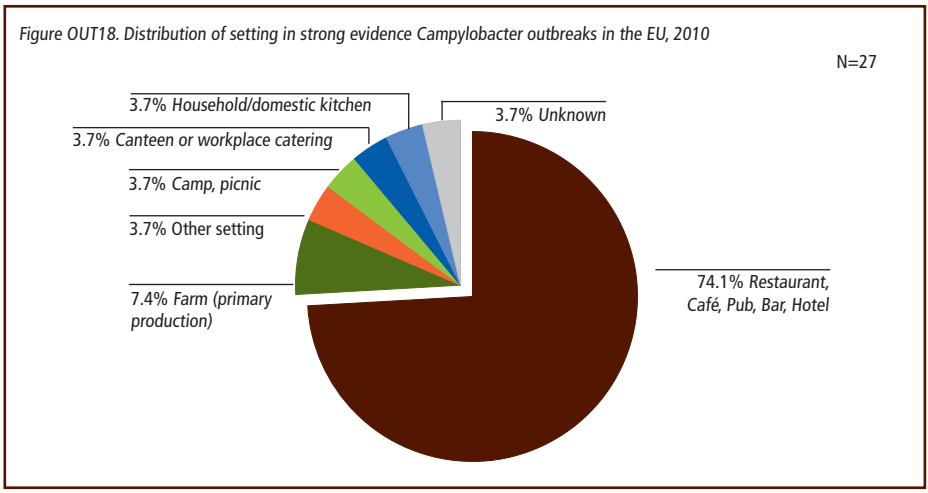


Figura 9. Establecimientos de restauración vinculados a la presentación de brotes de campilobacteriosis humana en la Unión Europea (año 2010). **Fuente:** (EFSA, 2012).

3. Evaluación de la exposición

Al evaluar la presencia de *Campylobacter* spp. en la carne de aves (pollos) conviene considerar la prevalencia del microorganismo en las explotaciones avícolas, matadero y posteriores etapas de comercialización.

La colonización del tracto intestinal de las aves con *Campylobacter* spp. depende de la eficacia de la implantación de los programas de bioseguridad en las explotaciones avícolas, ya que no existe transmisión vertical al huevo, y los pollitos nacen libres de *Campylobacter* spp. (FAO/OMS, 2001, 2002, 2003). Un estudio realizado en la Unión Europea sobre la prevalencia de *Campylobacter* spp. en heces de pollo, reveló en España un 82,2% de muestras positivas frente al 59,6% de 2009 (Figura 10).

Figura 10. Niveles de prevalencia de *Campylobacter* spp. en pollos en la Unión Europea (años 2008-2010).
Fuente: (EFSA, 2012)

Campylobacter in broilers, 2008-2010

	2010		2009		2008	
Country	***N***	***% pos***	***N***	***% pos***	***N***	***% pos***
Broilers (animal-based data)						
Czech Republic	-	-	-	-	422	69.9
France	196	78.1	191	80.6	-	-
Hungary[2]	439	66.5	713	78.0	325	54.2
Romania	51	100	104	100	-	-
Total animal-based (3 MSs in 2010)	**686**	**72.3**	**1,008**	**80.8**	**747**	**63.1**
Broilers (flock-based data)						
Austria[1]	394	46.7	326	55.5	-	-
Czech Republic[1]	134	72.4	-	-	422	61.1
Denmark[10]	3,132	16.5	4,591	29.4	4,912	25.9
Estonia[1]	47	0	48	0	-	-
Finland[1.6]	338	1.8	-	-	-	-
Finland[1.7]	1,409	6.0	1,720	4.8	1,276	6.5
Germany[2.4]	-	-	149	15.4	345	32.2
Germany[2.5]	-	-	332	10.2	-	-
Lithuania	-	-	-	-	374	42.0
Poland	-	-	-	-	420	79.0
Slovenia[1.8]	100	88.0	157	73.2	-	-
Slovenia[1.9]	99	92.9	149	83.9	-	-
Spain[1]	202	82.2	198	59.6	-	-
Sweden[1]	3,357	13.2	3,219	12.0	2,398	12.4
United Kingdom[1]	-	-	400	77.5	-	-
Total flock-based (8 MSs in 2010)	**9,212**	**18.2**	**11,289**	**24.1**	**10,147**	**24.7**
Norway[2.3]	2,170	5.1	1,924	6.1	4,675	4.1
Switzerland	400	33.0	442	44.3	-	-

Note: Data are presented only for sample sizes ≥ 25. Clinical investigations not included.

[1]*Slaughter batch-based data.*

[2]*At farm, Germany (2009). Hungary (2009) and Norway (2008-2010). For Norway (2008-2010), flocks sampled maximun four days before slaughter.*

[3]*Data from Norway 2009 and 2010 cover only the peak season, 1 May to 31 October.*

[4]*In Germany, surveillance in 2009.*

[5]*In Germany, monitoring in 2009.*

[6]*In Finland, sampling in January-May and November-December in 2010.*

[7]*In Finland, sampling between June and October in 2010.*

[8]*In Slovenia, caecum samples in 2010.*

[9]*In Solvenia, neck skin samples in 2010.*

[10]*Data from Denmark in 2010 are not comparable with previous years owing to a change in sampling strategy from cloacal swabs at slaughter to boot swabs 7-10 days prior to slaughter.*

En Suecia, la práctica totalidad de las aves se someten en el matadero a un control analítico de detección de *Campylobacter* spp. En un estudio realizado de julio de 2001 a junio de 2002, se encontró un 17% de muestras positivas tomadas de cloaca. Asimismo se puso de manifiesto que un 8% de muestras negativas en cloaca, resultaron positivas en los análisis de la piel, lo que demuestra contaminación a partir de los operarios y equipos de procesado. En este mismo estudio, los aislados obtenidos después del enfriamiento se compararon mediante análisis del perfil de restricción del ADN. Los aislamientos procedentes de las canales se compararon también con los procedentes de la cloaca y de la piel del cuello. Los resultados de este trabajo pusieron de manifiesto que 1/3 de las canales positivas albergaban más de un genotipo. Estos resultados son coincidentes con los de otros autores, que manifiestan que todas las canales se contaminan con el genotipo predominante durante la carnización de grupos de aves positivas a *Campylobacter* spp. (Lindmark et al., 2006).

Los estudios realizados sobre la colonización del tracto intestinal de las aves (EFSA, 2010) revelan que esta comienza a partir de los diez días tras el nacimiento, por lo que la edad se ha identificado como un factor de riesgo. La protección inicial se cree que es debida a la presencia de anticuerpos maternos protectores (Wassenar, 2011). Una vez que *Campylobacter* spp. coloniza a las primeras aves a partir del agua de bebida, roedores, insectos, operarios, etc., se extiende rápidamente a toda la manada que se vuelve positiva en menos de una semana. Son muchos los estudios que muestran la presencia de *Campylobacter* spp. en el interior de los diferentes protozoos presentes en el agua de bebida de las aves (Snelling et al., 2008). La mayor resistencia de los protozoos a la acción de los agentes utilizados en la desinfección del agua, incrementaría la capacidad de *Campylobacter* spp. para colonizar a las aves. Asimismo, la colonización es mayor en verano, lo que se atribuye a la temperatura y al incremento en el número de moscas que pueden actuar como vectores de transmisión. Por otra parte, en verano la ventilación y el consumo de agua aumentan debido a las elevadas temperaturas. Otra práctica de manejo que incrementa la colonización del tracto intestinal de las aves, es la relacionada con la disminución de la densidad de aves en las manadas que supone un estrés para estas, requiere tiempo, personal y equipos que actúan como fuente de transferencia del microorganismo a las aves. El personal que trabaja en las granjas y otros operarios que visitan la explotación pueden actuar también como fuentes de contaminación.

Las aves que son positivas a *Campylobacter* spp. eliminan con las heces concentraciones comprendidas entre 10^5 y 10^6 ufc/g (Lindmark et al., 2006). La concentración en el contenido cecal es normalmente elevada, pudiéndose alcanzar niveles de 10^{10} ufc/g en las aves de pocas semanas. Estos niveles tan elevados de excreción determinan la facilidad con la que toda la manada de aves se torna positiva a *Campylobacter* spp. y asegura la fácil dispersión del microorganismo a los materiales y equipos con los que contactan las aves no solo en la granja sino también durante el transporte y sacrificio en el matadero. En el matadero, las canales se pueden contaminar en distintas fases de la cadena de procesado sobre todo en las operaciones de escaldado-desplumado, evisceración y tanques de enfriamiento.

En la Figura 11 se recogen los datos de presencia de *Campylobacter* spp. en muestras de carne de pollo tomadas en matadero, plantas de procesado y comercio minorista. En 2010, 16 países de la Unión Europea remitieron datos a la Comisión, y la proporción de muestras positivas fue del 29,6% (con una

prevalencia que varió del 3,1 al 90,0%). En el caso de España, el porcentaje de muestras positivas tomadas en matadero fue del 44,6%, en plantas de procesado ascendió al 74,7% y en comercio minorista resultó ser de un 25,4%. En relación con la presencia de *Campylobacter* spp. en carne de otras aves diferentes del pollo, la incidencia de muestras positivas que remitió España fue del 23,9%, sin especificar a qué especies correspondían.

Figura 11. Presencia de *Campylobacter* spp. en carne de pollo (años 2008-2010). **Fuente:** (EFSA, 2012)

Campylobacter in fresh broiler meat, 2008-2010

			2010		2009		2008	
Country	***Sample unit***	***Sample weight***	***N***	***% pos***	***N***	***% pos***	***N***	***% pos***
At slaughter								
Belgium	*Single*	1 g	388	37.9	261	32.2	185	33.0
Denmark	*Single*	10 g/15 g	1,177	10.4	986	12.4	484	14.7
Estonia	*Batch*	1 g	47	8.5	48	6.3	-	-
Hungary	*Single*	25 g	170	54.1	-	-	-	-
Greece	*Single*	25 g	-	-	47	70.2	-	-
Ireland[4]	*Single*	*Various*	202	63.4	273	59.3	-	-
Italy	*Batch*	*Not indicated*	30	26.7	-	-	-	-
Poland	*Single*	400 cm^2	451	58.8	-	-	-	-
Romania[7]	*Batch*	1 g	225	40.4	266	34.2	-	-
Spain	*Single*	25 g	139	44.6	72	95.8	420	86.2
At processing plants								
Austria	*Single*	25 g	30	90.0	-	-	-	-
Belgium[1]	*Batch*	1 g	358	8.9	1,007	9.0	523	7.3
Germany	*Single*	25 g	107	47.7	45	35.6	78	33.3
Hungary	*Single*	25 g	77	29.9	291	26.8	-	-
Poland[6]	*Single*	10 g	118	89.0	-	-	-	-
Portugal	*Single*	25 g	108	19.4	-	-	-	-
Slovenia[8]	*Single*	1 g	100	79.0	101	67.3	-	-
Spain	*Single*	25 g	178	74.7	99	70.7	50	58.0
At retail								
Austria	*Single*	25 g	324	3.1	37	24.3	138	8.0
Belgium	*Batch*	1 g	439	12.1	199	12.1	-	-
Czech Republic	*Single*	25 g/27 g	-	-	120	75.0	-	-
Denmark[2]	*Single*	10 g/15 g	767	46.2	702	32.5	1,057	36.6
France	*Single*	1 g	-	-	120	90.0	-	-
	Single[9]	1 g	-	-	241	69.3	-	-
Germany[3]	*Single*[10]	25 g	681	28.5	633	28.6	887	36.4
	Single[11]	10 g	-	-	413	47.0	-	-
Hungary	*Single*	25 g	30	43.3	64	17.2	-	-
Latvia[5]	*Single*	25 g	50	10.0	-	-	205	9.8
Luxembourg	*Single*	10 g	68	58.8	84	79.8	122	49.2
Netherlands	*Single*	25 g	1,023	9.9	657	10.8	1,421	14.1
Slovenia	*Single*	25 g	-	-	106	78.3	315	74.6
Spain	*Single*	25 g	126	25.4	273	49.5	165	13.3
Sampling level not staded								
Italy	*Batch*	*Not indicated*	-	-	59	16.9	66	3.0
	Single	*Not indicated*	-	-	108	0	26	7.7
Total (16MSs in 2010)			**7,413**	**29.6**	**7,312**	**31.0**	**6,142**	**30.1**

4. Caracterización del riesgo y medidas de control

De acuerdo a los informes de ELIKA (2006), EFSA (2008a), EFSA (2010), EFSA (2011), EFSA (2012), FSA (2010) y de Vose Consulting (2011), existe una relación directa entre la prevalencia de *Campylobacter* spp. en las canales de pollo y la enfermedad en el hombre.

La reducción de las infecciones humanas por *Campylobacter* spp. puede lograrse mediante un mayor control de las operaciones de cría, transporte, sacrificio en el matadero, procesado y comercialización de las canales de aves para consumo humano (Ross y Sumner, 2002) (Rosenquist et al., 2003) (Sears et al., 2011) (Wassenaar, 2011) (Silva et al., 2012). Los informes de ELIKA (2006) y EFSA (2011) recomiendan las siguientes medidas de control:

Programas de bioseguridad en explotaciones avícolas

Los programas de bioseguridad en explotaciones avícolas deben contemplar:

- Formación de los trabajadores de la explotación en la importancia de minimizar la transmisión de *Campylobacter* spp. y otros patógenos a través del calzado, ropa, manos, etc. Por ello, se deberá disponer de calzado y ropa de uso exclusivo en la explotación, además de adecuadas instalaciones para la higiene personal.
- Control del personal ajeno a la explotación que pueda acceder a ella. Empleo de protectores de calzado y ropa desechables.
- Desinfección de vehículos que puedan acceder a la explotación.
- Incorporación de programas adecuados de limpieza, desinfección, desinsectación y desratización.
- La instalación de mosquiteras en las ventanas evita el acceso de insectos a las naves y disminuye esta vía de transmisión sobre todo en verano cuando se elevan los niveles de animales positivos. En la producción primaria, el empleo de mosquiteras reduciría el riesgo de la campilobacteriosis en el hombre entre un 50-90%.
- Evitar la utilización de agua procedente de pozos sin tratar, o insuficientemente tratada ya que se incrementa el nivel de positividad de la manada a *Campylobacter* spp. Es necesaria la higienización del agua mediante cloración, ozonización, radiación ultravioleta, etc. En ocasiones se ha puesto de manifiesto la presencia de *Campylobacter* spp. en el interior de protozoos del agua o del suelo, lo que incrementa su resistencia a la acción del cloro.
- *Campylobacter* spp. al igual que otros patógenos emergentes zoonóticos, se encuentra en reservorios animales por lo que la disminución de su presencia podría realizarse mediante la incorporación a los piensos de probióticos, prebióticos, bacteriófagos, péptidos antimicrobianos o bacteriocinas (Loc Carrilo et al., 2005) (Stern et al., 2006) y aditivos (ácido caprílico, sorbato potásico. ácido propiónico, etc.). La administración de bacteriocinas o bacteriófagos a los pollos dos o tres días antes del sacrificio reduce la colonización intestinal de las aves con *Campylobacter* spp. en tres unidades $\log_{10}$. Una reducción de tres unidades $\log_{10}$ en el intestino de las aves que van a sacrificarse, disminuiría el riesgo para el hombre en un 90%.
- Reducir la práctica de disminución de la densidad de aves en las naves disminuiría el riesgo de colonización de estas con *Campylobacter* spp. y reduciría el riesgo para el hombre en un 25%.
- La reducción de la edad de sacrificio también se ha identificado como un factor de riesgo. La pre-

valencia de manadas positivas está directamente relacionada con la edad de sacrificio. Se podría lograr hasta un 50% de reducción del riesgo, disminuyendo la edad de sacrificio a un máximo de 28 días. En Suecia, donde el sacrificio de las aves se realiza entre los 33-35 días, se ha comprobado que cuando se eleva la edad a los 42-44 días, se duplica el número de aves positivas y si se efectúa entre los 48-61 días, se multiplica por cuatro. Un estudio de EFSA de 2010 muestra que el riesgo de colonización de las aves con *Campylobacter* spp. se dobla cada diez días que aumenta su edad (EFSA, 2010).

- Desarrollo de programas de selección genética. El objetivo es disponer de reproductores resistentes a la colonización por *Campylobacter* spp.
- Utilización de técnicas microbiológicas rápidas para identificar manadas de aves positivas antes del sacrificio en el matadero y poder realizar este al final de la jornada (Krause et al., 2006).

En la Figura 12, se resumen las estrategias de control al nivel de las explotaciones animales.

Figura 12. Medidas de control en producción primaria para reducir la campilobacteriosis humana. **Fuente:** (EFSA, 2011)

Overall summary of effects of interventions			
	Efficacy for Campylobacter reduction at the point of application	***Modelled***	***References***
Hygiene/biosecurity	*At 21 days: from 20.0% to 7.7% between-flock prevalence (BFP)*	*Yes*	*Gibbens et al., 2001*
	At 28 days: from 32.0% to 12.0% BFP		
	At 35 days: from 44.0% to 30.8% BFP		
	At 42 days: from 70.8% to 38.5% BFP		
	Implemented in model as the beta coefficient that corresponds to a bazard ratio of 0.40, (0.15, 1.09) p = 0.06		
Fly screens	*At 21 days: from 11.4% to 5.8% BFP*	*Yes*	*Hald et al., 2007*
	At 28 days: from 28.6 to 5.8% BFP		
	At 35 dats: from 45.5% to 7.7% BFP		
	Implemented in model as a slaughter age-weighted k-factor or 0.47 (21 days of slaughter age) 0.15 (28 days of slaughter age) and 0.10 (35 days of slaughter age)		
Discontinued thinning	*BFP estimate OR = 1.74, implemented in model as regression coefficient (0.5521)*	*Yes*	*EFSA, 2010a*
Slaughter age	*BFP estimate OR = 1.98 per 10 days increase, implemented in model as regression coefficient (0.06742)*	*Yes*	*EFSA, 2010a*
Vaccination	*2 log_{10} reduction in caecal contents*	*No*	*de Zoete et al., 2007*
Bacteriocins	*5.1-5.9 log_{10} reduction in caecal contents*	*No*	*Svetoch et al., 2008*
Bacteriophages	*3 log_{10} reduction in caecal contents*	*No*	*Wagenaar et al., 2005*
Drinking water treatment with organic acids	*0.5-2 log_{10} reduction in caecal contents*	*No*	*Chaveerach et al., 2004*
Feed additives	*No effect to complete inhibition*	*No*	*Hilmarsson et al., 2006* *Solis de los Santos et al., 2010* *Skanseng et al., 2010*

Transporte animal

El cumplimiento de las normas de bienestar animal en el transporte contribuye a disminuir el número de animales colonizados con *Campylobacter* spp. Es necesario minimizar el estrés que sufren los animales, reducir el tiempo y las distancias al lugar de sacrificio. Asimismo, es fundamental la aplicación de programas de limpieza y desinfección estrictos de las jaulas y vehículos de transporte (Figura 13).

Matadero

En el matadero, la implantación adecuada del sistema APPCC es determinante para reducir el número de *Campylobacter* spp. en las canales. Es importante minimizar las contaminaciones cruzadas a partir

de los equipos de procesado, útiles empleados en la carnización, operarios, etc. Especial control requieren las desplumadoras y los tanques de enfriamiento (Figura 13).

Los sacrificios programados permiten identificar las manadas de aves positivas a *Campylobacter* spp. antes del sacrificio, de forma que puedan adoptarse métodos de control.

De acuerdo a los resultados procedentes de diversos estudios de análisis de riesgo, las medidas de control más efectivas para disminuir el riesgo de la campilobacteriosis en el hombre consistirían en la aplicación de técnicas de descontaminación o higienización de las canales tras el sacrificio en el matadero. Tras el sacrificio, se puede conseguir un 100% de reducción mediante la aplicación de la irradiación o del tratamiento térmico, siempre que se evite la recontaminación. Los lavados de la canal con agua caliente, ácido láctico, clorito sódico ácido o fosfato trisódico permiten reducciones en el riesgo comprendidas entre 50-90%. El simple lavado con agua caliente (80 ºC durante 20 segundos) consigue reducciones en el riesgo entre un 50-90%.

La reducción de los recuentos de *Campylobacter* spp. en las canales en una unidad $\log_{10}$, disminuiría el riesgo entre un 40-90%. La reducción de más de dos unidades $\log_{10}$, aminoraría el riesgo para el hombre en más de un 90%.

En algunos países como Dinamarca, las canales negativas se comercializan frescas y la que son positivas se congelan. La congelación disminuyen el número de microorganismos viables, pero algunos pueden sobrevivir. No obstante, la demanda de carne fresca es muy superior a la de congelada. Más de un 90% de reducción se puede lograr con la congelación de las canales por un periodo de 2-3 semanas y de un 50-90% por periodos de 2-3 días.

Con relación al establecimiento de criterios microbiológicos, se considera que podrían conseguirse reducciones >50% o al 90% si la carne de ave que se vende fresca tuviera niveles máximos de 1.000 o 500 ufc por gramo o cm^2 en la piel del cuello y pechuga.

El Reglamento (CE) Nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los productos de origen animal (UE, 2004), establece en su artículo 3.2 que los operadores de empresa alimentaria no utilizarán para eliminar la contaminación de superficie de productos de origen animal ninguna sustancia distinta del agua potable o, cuando el Reglamento (CE) Nº 852/2004 o el 853/2004 autorice su uso, distinta del agua limpia, a menos que el uso de dicha sustancia haya sido autorizado con arreglo al procedimiento previsto en el apartado 2 del artículo 12.

El artículo 13 del Reglamento (CE) Nº 853/2004 también establece que la Comisión consultará a la Autoridad de Seguridad Alimentaria sobre cualquier cuestión que pueda tener repercusiones sanitarias importantes. En este sentido, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, ha considerado en varios informes que el tratamiento de la canales de pollo con soluciones de fosfato trisódico, bicloruro sódico, dióxido de cloro o peroxiácido, no supone ningún riesgo para el consumidor. Asimismo, recomendaba que se aplicase preferiblemente con espray en lugar de con tratamientos de inmersión (EFSA, 2005, 2008b). Sin embargo, el Consejo de la Unión Europea ha rechazado la utilización de sustancias antimicrobianas para eliminar la contaminación microbiana de las canales de aves de corral en espera de disponer de información científica adicional que permita una determinación del riesgo más exhaustiva en relación con la posibilidad de que la aprobación de estas sustancias dé lugar a un aumento de la resistencia a antimicrobianos que afecte a los seres humanos, por lo que actualmente no existen

sustancias descontaminantes autorizadas en la Unión Europea (UE, 2009). Otras alternativas serían la irradiación, altas presiones, pulsos eléctricos, etc. (Liu et al., 2012).

Figura 13. Medidas de control en el transporte y sacrificio en el matadero para reducir la campilobacteriosis humana. **Fuente:** (EFSA, 2011)

	Efficacy for Campylobacter reduction at the point of application	***Modelled***	***References***
Interventions during transport and before slaughter			
Feed withdrawal	*Various results and various outcomes*	*No*	
Crate treatment	*7.5 log_{10} per crate compartment; 5.5 log per crate surface, 40-60% reduction of crate positivity*	*No*	*Berrang et al., 2004a* *Allen et al., 2008a* *Slader et al., 2002*
Interventions at slaughter			
Prevention of leakage of intestinal contents	*0.9 log_{10} CFU reduction on carcass*	*No*	*Boysen and Rosenquist, 2009*
Detection/re-processing of highly (faecally) contaminated carcasses	*1.75 log_{10} CFU on carcass*	*No*	*Kemp et al., 2001*
Cloacal plugging	*0.53-1.7 log_{10} CFU reduction*	*No*	*Musgrove et al., 1997* *Berrang et al., 2001* *Buhr et al., 2003*
Scheduled slaughter (positive batches are scheduled to a risk reducing procedure such as freezing or heat treatment)	*Depends on risk reducing procedure*	*Yes (not directly in model, but included by using baseline results and assuming a 100% effective treatment on scheduled batches*	*Hofshagen et al., 2008* *EFSA, 2010a*
Logistic slaughter (the slaughter of negative batches before the positive)	*Very little effect*	*No*	*Havelaar et al., 2007*
Interventions post slaughter			
Chemical decontamination of carcasses			
Lactic acid (2%)	*0.47 log_{10} reduction (through inside-outside bird washer (IOBW)* *0.74 log_{10} reduction (inoculated skin)*	*Yes*	*Bolder, 2007* *Riedel et al., 2009*
Acidified sodium chlorite (1,200 mg/l)	*1.26-1.75 log_{10} reduction (sprayed after IOBW)* *1.75 log_{10} reduction (sprayed after IOBW)* *0.5 log_{10} cycles (in IOBW)* *0.5-1 log_{10} when sprayed at 1,000 ppm*	*Yes*	*Bashor et al., 2004* *Kemp et al., 2001* *Bolder, 2007* *Corry et al., 2008*
Chlorine dioxide (50-100 mg/l)	*0.49 log_{10} reduction (4.25 ppm in IOBW)* *0.99-1.21 log_{10} reduction (50 or 100 ppm, dip-inoculated)*	*No*	*Bolder, 2007* *Hong et al., 2008*

Figura 13. Medidas de control en el transporte y sacrificio en el matadero para reducir la campilobacteriosis humana. **Fuente:** (EFSA, 2011)

	Efficacy for Campylobacter reduction at the point of application	***Modelled***	***References***
Chemical decontamination of carcasses			
Trisodium phosphate (10-12%, pH 12)	*1.03 log_{10} reduction (spray)* *1.2 log_{10} reduction (dipping at 50 ºC)* *No effect of dipping at 20 ºC* *0.5 log_{10} when sprayed at 12%*	*Yes*	*Bashor et al., 2004* *Slavik et al., 1994* *Whyte et al., 2001b* *Corry et al., 2008*
Acidified electrolysed oxidising water (immersion)	*1.07 log_{10} reduction*	*No*	*Kim et al., 2005*
Peracetic (peroxyacetic) acid	*43% reduction of positive carcases*	*No*	*Bauermeister et al., 2008a*
Physical decontamination of carcasses			
Freezing for few days	*0.91-1.44 log_{10} reduction*	*Yes*	*Sandberg et al., 2005* *Georgsson et al., 2006a* *Rosenquist et al., 2006*
Freezing for 3 weeks	*1.77-2.18 log_{10} reduction*	*Yes*	*Sandberg et al., 2005* *Georgsson et al., 2006a*
Hot water immersion	*1.25 log_{10} reduction*	*Yes*	*Corry et al., 2006*
Irradiation	*6 log_{10} reduction*	*Yes*	*Farkas, 1998 or expert opinion*
Cooking	*6 log_{10} reduction*	*Yes*	*Whyte et al., 2006*
Crust-freezing	*0.42 log_{10} reduction*	*No*	*Boysen and Rosenquist, 2009*
Steam	*0.46 log_{10} reduction*	*No*	*Whyte et al., 2003*
Steam ultrasound	*1.3-2.51 log_{10} reduction*	*No*	*Boysen and Rosenquist, 2009*

Las ventajas e inconvenientes de las medidas de control citadas se resumen en la Figura 14.

Figura 14. Ventajas e inconvenientes de las medidas de control aplicadas en producción primaria, transporte y sacrificio en matadero para reducir la campilobacteriosis humana. **Fuente:** (EFSA, 2011)

Advantages, disadvantages and availability of interventions			
	Advantages in addition to a possible Campylobacter reducing effect	***Disadvantages***	***Availability***
Interventions in primary production			
Hygiene/biosecurity	*Excludes other infectious (animal) diseases as well, some of economic importance*	*Complex mixture of factors, difficult to define and audit*	*Immediately available, but migh need modification of poultry houses*
	Reduces environmental contamination and indirect transmission to humans	*Very stringent implementation needed. Farmer compliance required. Only fully appicable to indoor rearing*	*General principles are well known but needs to be evaluated under local conditions. Only one intervention experiment in UK avalilable*
Fly screens	*Reminds the farmers of need for hygiene*	*Only fully applicable to indoor rearing*	*Rapidly available in theory*
	Effective against seasonal peak in birds	*Applicability depends on construction of poultry houses*	*Only tested in Denmark and Iceland*
	Reduces environmental contamination and indirect transmission to humans	*Needs maintenance for keeping efficiency*	
Discontinued thinning	*Avoids stress at thinning*	*Interferes with current industrial practices*	*Immediately available, in theory*
	Increased animal welfare	*Productivity and flexibility of industrial production will be altered*	
Reduction of slaughter age	*Potentially increased animal welfare*	*Interferes with current industrial practices*	*Immediately available, in theory*
		Productivity and flexibility of industrial production will be altered	
		For the organic and traditional free range chickens, the slaughter age must not be ower than 81 days	
Vaccination	*Applicable to both indoor and outdoor rearing*	*Most studies have been poorly reproducible*	*Vaccines are still in the development phase*
	Multiple vaccines are often applied at same time and systems for the mass application of vaccines are available		
Bacteriocins	*Applicable to both indoor and outdoor rearing*	*Scale-up of bacteriocin production and purification remains to be further elaborated*	*Preparations have been described, and patents have been applied for*

Figura 14. Ventajas e inconvenientes de las medidas de control aplicadas en producción primaria, transporte y sacrificio en matadero para reducir la campilobacteriosis humana. **Fuente:** (EFSA, 2011)

Advantages, disadvantages and availability of interventions			
	Advantages in addition to a possible Campylobacter reducing effect	***Disadvantages***	***Availability***
		Small-scale studies from only one research groups, its reproducibility remains to be confirmed *Sustainability to be confirmed and take into account the variety of Campylobacter species, genotypes and the species' genetic variability* *Safety aspects for use to be confirmed*	*Not yet tested on large scale*
Bacteriophages	*Applicable to booth indoor and outdoor rearing*	*Emergence of phage-resisten Campylobacter strains needs to be further evaluated under field conditions* *Multiple phage populations will be required taking nto account the variety of Campylobacter species, genotypes and the species' genetic variability* *Sustainability to be confirmed*	*Only tested in small scale experiments*
Drinking water treatment with organic acids		*Biofilms on drinkers may be a challenge* *Low pH to control biofilm build-up could lead to welfare issues* *Palatability for birds*	*Conflicting evidence on effectiveness* *Not yet tested on large scale*
Feed additives		*In some studies a reduced growth rate was observed*	*Not yet tested on large scale*
Interventions during transport and before slaughter			
Feed withdrawal	*Current guidelines based ond animal welfare considerations appear to be optimal for control of Campylobacter contamination as well*	*Inadequate available data, complex variables and confounding factors involved make it difficult to assess any beneficial effect of feed withdrawal or good hygiene practiques during transportation and holding before slaughter.* *Not yet tested on a large scale*	*Immediately available*
Crate treatment	*Limits spreading of faeces*	*Inadequate available data, complex variables and confounding factors*	*Not yet tested on a large scale*

Figura 14. Ventajas e inconvenientes de las medidas de control aplicadas en producción primaria, transporte y sacrificio en matadero para reducir la campilobacteriosis humana. **Fuente:** (EFSA, 2011)

Advantages, disadvantages and availability of interventions			
	Advantages in addition to a possible Campylobacter reducing effect	***Disadvantages***	***Availability***
		involved make it difficult to assess any beneficial effect of crate treatment	
Interventions at slaughter			
Prevention of faecal leakage	*Can be applied to colonized flocks*	*Interferes with current industrial practices using high-throughput slaugthering and processing lines* *Effect post-chill needs to be investigated*	*Equipment not commercially available*
Detection/re-processing of highly faecal-contaminated carcasses	*Eliminates high level contaminated carcasses*	*Effect on-line has not been demonstrated*	*Immediately available*
Cloacal plugging	*Can be applied to colonized flocks*	*Complex methodology*	*Equipment not commercially available*
Scheduled slaughter (positive batches are scheduled to a risk reducing procedure such as freezing or heat treatment)	*Reduces the number of flocks to be subjected to further treatment, if considered*	*Particularly effective in low prevalence countries* *Need of reliable and sensitive testing methods for Campylobacter spp.*	*Immediately available* *No internationally standardized PCR-method available*
Logistic slaughter (the slaughter of negative batches before the positive)		*Impractical if high between-flock prevalence* *Need of reliable and sensitive testing methods for Campylobacter spp.* *Testing must be done as close to slaughter as possible* *May also need to consider Salmonella carriage* *Not effective for public health as numbers of Campylobacters on negative batches processed after positive ones are very low*	*Immediately available*
Interventions post slaughter			
Chemical decontamination of carcasses			
All chemicals		*Risk of residues and by-products* *Issues of waste water management*	*Available in the short term* *Currently no chemicals are approved in the EU*

Figura 14. Ventajas e inconvenientes de las medidas de control aplicadas en producción primaria, transporte y sacrificio en matadero para reducir la campilobacteriosis humana. **Fuente:** (EFSA, 2011)

Advantages, disadvantages and availability of interventions			
	Advantages in addition to a possible Campylobacter reducing effect	***Disadvantages***	***Availability***
Lactic acid	*Occurs naturally in meat* *No organoleptic effect when used at low concentrations, e.g. 2%*	*Carcass discoloration might occur at high* *Concentrations 2% lactic acid would not significantly affect carcass colour*	*Available in the short term* *Currently not approved in the EU*
Acidified sodium chlorite	*Effective as a dip or spray*	*Unpleasant for operatives* *Has to be prepared on-site*	*Available in the short term* *Currently not approved in the EU*
Chlorine dioxide	*Better effect can be expected post-washing*	*Conflicting results* *Unstable and has to be prepared on-site* *Effect will depend on presence of organic substances*	*Available in the short term* *Currently not approved in the UE*
Trisodum phosphate	*Effective as a dip or spray*	*Negative environmental impact of phosphates* *Unpleasant for operatives*	*Available in the medium term* *Currently not approved in the EU*
Acidified electrolysed oxidising water (immersion)	*Could be used during water chilling*	*Not tested on-line or on naturally contaminated carcases*	*Available in the short term* *Currently not approved in the EU*
Peracetic (peroxyacetic) acid		*Not tested on-line or on naturally contaminated carcasses*	*Available in the short term* *Currently not approved in the EU*
Physical decontamination of carcasses			
All physical treatments	*No residues*	*Energy consuming*	*Can be used in without specific authorisation all EU countries (except irradiation)*
Freezing for few days/ 3 weeks	*Proven on production scale.* *Effective and implemented in some countries*	*Thawing causes drip, which may caused cross-contamination*	*Available in the short term*
Hot water immersion	*Product still fresh*	*Reduced product quality (appearance affected in some studies)* *No on-line equipment available*	*Available in the medium term*
Irradiation	*Product still fresh* *Eliminates Campylobacters inside the muscle and liver*	*Not feasible for whole carcasses unless x-rays or gamma radiation from isotopes used*	*Available in the medium term* *Not authorised for use in all EU countries*

Figura 14. Ventajas e inconvenientes de las medidas de control aplicadas en producción primaria, transporte y sacrificio en matadero para reducir la campilobacteriosis humana. **Fuente:** (EFSA, 2011)

Advantages, disadvantages and availability of interventions

	Advantages in addition to a possible Campylobacter reducing effect	***Disadvantages***	***Availability***
Cooking	*No residues*	*Not fresh meat anymore* *May only be possible to apply to a small proportion of products* *Variability in survival depending upon the product, the strain and the procedure for heat treatment (pan-frying, oven heating, etc)* *May not be popular with consumers*	*Immediately available, in theory*
Crust-freezing	*Product still fresh*	*Only proven on-line for breast fillets, not feasible for whole carcasses*	*Available in the short term*
Steam	*Product still fresh* *In-line equipment could be designed and installed easily on existing lines* *No issue with waste disposal*	*Reduced product quality (appearance affected in some studies)* *Slight shrinkage of skin which becomes less pronounced after storage* *No on-line equipment available*	*Available in the medium term*
Steam ultrasound	*No residues* *Product still fresh*	*Slightly boiled appearance of skin using proof-of-concept apparatus (highest efficacy)* *Product quality maintained using on-line equipment (lower efficacy)*	*Available in the short term*

La Figura 15 recoge un resumen de los estudios de reducción de riesgo en función de las medidas de control adoptadas.

Figura 15. Resultados de la aplicación de diferentes medidas de control en la reducción de la presencia de *Campylobacter* spp. en carne de pollo. **Fuente:** (EFSA, 2011)

Examples of reported risk reductions as a consequence of reduction on Campylobacter concentrations due to the application of control options along the broiler meat processing chain

Reference of QMRA	*Point of the chain*	*Target parameter*	*Effect (log_{10} reduction)*	*Risk reduction (% of human incidence)*
Rosenquist et al., 2003			–2	97%
• *generic reduction of concentration on carcasses*				
Lake et al., 2007			–1	71%
• *generic reduction of concentration on carcasses*			–2	88%
Brynestad et al., 2008			–0.2	30%
• *generic reduction of concentration on carcasses*	*Processing plant*	*Log_{10} number (CFU) of Campylobacter on carcass*		
Linqvist and Lindblad, 2008			–2	92%-97%[1]
• *generic reduction of concentration on carcasses*				
FAO/WHO, 2009b			–0.25	11%-82%[2]
• *generic reduction of concentration on carcasses*				
Nauta et al., 2005b and Havelaar et al., 2007[3]	*Farm*	*Log_{10} number (CFU) of Campylobacter in faeces*	–1/–2/–2	74.4%
Phage therapy				
Reduction of faecal leakage	*Processing plant*	*Log_{10} number (CFU) of Campylobacter in faeces*	0/–6/–∞	77.1%
Decontamination in the scalding tank:	*Processing plant*	*Log_{10} number (CFU) of Campylobacter on carcass*	–0.3/–0.8/–2	12.4%
• *by adding lactase*			–1.03/–1.24/–1.5	18%
• *by adding TSP (trisodium phosphate)*				
Decontamination before chilling:	*Processing plant*	*Log_{10} number (CFU) of Campylobacter on carcass*	–0.3/–1.3/–2	86.9%
• *using lactic acid*			–1.03/–1.24/–1.5	90.6%
• *using TSP (trisodium phosphate)*				
Other decontamination measures:	*Processing plant*	*Log_{10} number (CFU) of Campylobacter on carcass*	–0.3/–1.3/–2	77%
			3[2](–0.27/–0.6/–0.83)	80%
• *only dipping*			–0.4/–1.1/–1.7	82.8%
• *dipping and spraying*			–4.7/–10.5/–20.8	100%
• *crust freezing*			–0.9/–1.7/–3.2	94.9%
• *irradiation*				
• *freezing of products*				

Figura 15. Resultados de la aplicación de diferentes medidas de control en la reducción de la presencia de *Campylobacter* spp. en carne de pollo. **Fuente:** (EFSA, 2011)

Examples of reported risk reductions as a consequence of reduction on Campylobacter concentrations due to the application of control options along the broiler meat processing chain

Reference of QMRA	*Point of the chain*	*Target parameter*	*Effect (log_{10} reduction)*	*Risk reduction (% of human incidence)*
Gellynck et al., 2008[3]				
Phage therapy	*Farm*	*Log_{10} number (CFU) of Campylobacter in faeces*	–1/–2/–3 (–1 *on external*)	53/-76%-82%
Carcass decontamination	*Processing plant*	*Log_{10} number (CFU) of Campylobacter on carcass*	–0.4/–1.1/–1.7	32%-61%-82%
• *crust freezing*			–0.3/–1.3/–2	0%-38%-72%
• *lactic acid*[4]			–1.1/–2.3/–3	28%-80%-91%
• *electrolyzed oxidizing water*[4]			–4.7/–10.5/–20.8	99.8%-100%-100%
• *irradiation*				

[1]*If fresh or frozen chicken respectively are considered.*

[2]*Depeding on the initial concentration equal to 6 log CFU and 2 log CFU respectively.*

[3]*Based on three different levels of efficacy (pesimistic, most likely, optimistic) of each measure. The outcomes are expressed as mean risk reduction values.*

[4]*Used to replace carcass washing.*

Procesado, distribución y preparación culinaria en restauración o en el ámbito doméstico

Las industrias de procesado deben aplicar correctamente el sistema APPCC. Por otra parte, sería interesante que los productos que se comercializan crudos incorporaran una etiqueta de información al consumidor indicando o advirtiendo que aunque la carne proceda de animales que han pasado la inspección veterinaria en el matadero, puede contener patógenos lo que implica la necesidad de una manipulación higiénica correcta acompañada de un correcto tratamiento térmico. La manipulación de la carne cruda de pollo y las contaminaciones cruzadas durante la preparación de los alimentos en el ámbito doméstico o de la restauración es un punto crítico de control en la disminución de la campilobacteriosis humana. La formación y educación de los consumidores es esencial si queremos disminuir la incidencia de las enfermedades de transmisión alimentaria que tienen una etiología microbiana. Asimismo, se debe prestar atención a las mascotas, sobre todo gatos ya que son una fuente de transmisión de *Campylobacter* spp. y pueden contaminar superficies y alimentos.

Conclusiones del Comité Científico

Las estrategias para el control de *Campylobacter* spp. en la carne de pollo tienen que estar basadas en la estricta aplicación de las Buenas Prácticas Higiénicas (GHP) y del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) por parte de los operadores de las industrias alimentarias. Entre las medidas propuestas se incluyen: 1) implantación de programas de bioseguridad en explotaciones avícolas que reduzcan la colonización de las aves, 2) minimizar las contaminaciones cruzadas en el matadero, 3) implementación de técnicas autorizadas de higienización de canales, 4) manipulación higiénica y correcto tratamiento térmico en la preparación culinaria de los alimentos previa al consumo,

y 5) formación de los consumidores como agentes activos en la prevención de las enfermedades de transmisión alimentaria.

Referencias

Allos, B.M. (2001). *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clinical Infectious Disease*, 32, pp: 1201-1206.

Baker, M.G., Kvalsving, A., Zhang, J., Lake, R., Sears, A. y Wilson, N. (2012). Declining Guillain-Barré syndrome after Campylobacteriosis control, New Zealand, 1988-2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18, pp: 226-233.

Cawthraw, S.A., Lind, L., Kaijser, B. y Newell, D.G. (2000). Antibodies directed towards Campylobacter jejuni antigens, in sera from poultry abattoir workers. *Clinical Experimental Immunology*, 122, pp: 55-60.

Doyle, M.P. y Erickson, M.C. (2006). Emerging microbiological food safety issues related to meat. *Meat Science*, 74, pp: 98-112.

Duim, B., Ang, C.W., Belkum, A., Van A. Rigter, N., Van Leeuwen, W.J., Endtz, H.P. y Wagenaar, J.A. (2000). Amplified fragment length polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from chickens and from patients with gastroenteritis or Guillain-Barré or Miller Fisher syndrome. *Applied Environmental Microbiology*, 66, pp: 3917-3923.

EFSA (2005). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids. *The EFSA Journal*, 297, pp: 1-27.

EFSA (2006). European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal*, 94, pp: 3-288.

EFSA (2007). European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal*, 130, pp: 1-10.

EFSA (2008a). European Food Safety Authority. Assessing health benefits of controlling *Campylobacter* in the food chain. *EFSA Scientific Colloquium Summary Report*, pp: 1-181. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/colloquiacampylobacter.pdf [acceso: 18-9-12].

EFSA (2008b). European Food Safety Authority. Assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. *The EFSA Journal*, 659, pp: 1-26.

EFSA (2010). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *The EFSA Journal*, 8 (1): 1.437, pp: 1-89.

EFSA (2011). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Campylobacter in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *The EFSA Journal*, 9 (4): 2.105, pp: 1-141.

EFSA (2012). European Food Safety Authority. Scientific report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *The EFSA Journal*, 10 (3): 2.597, pp: 1-442.

ELIKA (2006). Fundación Vasca de la Seguridad Alimentaria. Evaluación del riesgo por *Campylobacter jejuni* en carne de aves en la Comunidad Autónoma del País Vasco. Disponible en: http://www.elika.net/es/riesgos_biologicos.asp [acceso: 18-9-12].

FAO/OMS (2001). Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods. Hazard identification, exposure assessment and hazard characterization of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp in seafood. WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, del 23 al 27 de julio.

FAO/OMS (2002). Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp. in seafood. Bangkok, Thailand, del 5 al 9 de agosto.

FAO/OMS (2003). Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Joint WHO/FAO Food Standards Programme. Discussion paper on risk management strategies for *Campylobacter* spp. in poultry. Orlando, Florida, del 27 de enero al 1 de febrero.

Fouts, D.E., Mongondin, E.F., Mandrell, R.E., William G. Miller, Rasko, D.A., Ravel, J., Brinkac, L.M., DeBoy, R.T., Parker, C.T., Daugherty, S.C., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Madupu, R., Sullivan, S.A., Shetty, J.U., Ayodeji, M.A., Shvartsbeyn, A., Schatz, M.C., Badger, J.H., Fraser, C.M. y Nelson, K.E.(2005). Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* spp. *Plos Biology*, 3, pp: 1-14.

Friedman, C., Neimann, J., Wegener, H. y Tauxe, R. (2000). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. En libro: *Campylobacter*, 2ª edición. Washington DC. Nachamkin, L. y Blaser, M.J. ASM Press.

FSA (2010). Food Standards Agency. Citizens' forums-*Campylobacter*. Disponible en: http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/citforumcampy.pdf [acceso: 18-9-12].

Ganan, M., Silván, J.M., Carrascosa, A.V., y Martínez-Rodríguez, A.J. (2012). Alternative strategies to use antibiotics or chemicals products for controlling *Campylobacter* in the food chain. *Food Control*, 24, pp: 6-14.

Haddad, N., Marce, C., Magras, C. y Cappelier, J.M. (2010). An overview of methods used to clarfy pathogenesis mechanisms of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Food Protection*, 73, pp: 786-802.

Hadden, R.D.M. y Gregson, N.A. (2001). Guillain-Barré syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 90, pp: 145S-154S.

Hernández, P.E. (2010). Bacterias patógenas emergentes transmisibles por los alimentos. En libro: *Aspectos Higiénicos de los Alimentos Microbiológicamente Seguros*. Sanz, B. Instituto de España. Real Academia de Farmacia, pp: 147-179.

Hofreuter, D., Tsai, J., Warson, R.O., Novik, B., Altman, M., Benitez, C., Clark, C., Perbost, T., Jarvie, L., y Galán, J.E. (2006). Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infection Immunity*, 74, pp: 4694-4707.

Humphrey, T. y Jorgensen, F. (2006). Pathogens on meat and infection in animals - Establishing a relationship using *Campylobacter* and *Salmonella* samples. *Meat Science*, 74, pp: 89-97.

Krause, M., Josefsen, M.H., Lund, M., Jacobsen, N.R. Brorsen, L., Moos, M., Stockmarr, A. y Hoorfar, J. (2006). Comparative, collaborative, and on-site validation of a taqMan PCR method as a tool for certified production of fresh, *Campylobacter*-free chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, pp: 5463-5468.

Lindmark, H., Diedrich, C., Andersson, L., Lindqvist, R. y Olsson Engvall, E. (2006). Distribution of *Campylobacter* genotypes on broilers during slaughter. *Journal of Food Protection*, 69, pp: 2902-2907.

Liu, Y., Betti, M. y Gänzle, G. (2012). High pressure inactivation of *Escherichia coli, Campylobacter jejuni*, and spoilage microbiota on poultry meat. *Journal of Food Protection*, 75, pp: 497-503.

Loc Carrillo, C., Atterbury, R.J., El-Shibiny, A., Connerton, P.L., Dillon, E., Scott, A. y Connerton, I.F. (2005). Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, pp: 6554-6563.

Nachamkin, I. (1997). *Campylobacter jejuni*. En libro: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington. Doyle, M.P., L.R. Beuchat y T.J. Montville. ASM Press.

Nachamkin, I. (2002). Chronic effects of *Campylobacter* infection. *Microbes and Infection*, 4, pp: 399-403.

Newell, D.G. y Wagenaar, J.A. (2000). Poultry infections and their control at the farm level. En libro: *Campylobacter*, 2ª edición. Washington, D.C. Nachamkin, I. y Blaser, M.J. American Society for Microbiology, pp: 497-509.

Nicholson, F.A., Groves, S.J. y Chambers, B.J. (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresources Technology*, 96, pp: 135-143.

Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T.,Holroy, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., van Vliet, A.H., Whitehead, S. y Barrell, B.G. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403, pp: 665-668.

Riedel, C.T., Brondsted, L., Rosenquist, H., Haxgart, S.N. y Christensen, B.B. (2009). Chemical decontamination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin and meat. *Journal of Food Protection*, 72, pp: 1173-1180.

Rosenquist, H., Nielsen, N.L., Sommer, H.M., Norrung, B. y Christensen, B.B. (2003). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 83, pp: 87-103.

Rosenquist, H., Sommer, H.M., Nielsen, N.L. y Christensen, B.B. (2006). The effect of slaughter operations in the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter. International Journal of Food Microbiology*, 108, pp: 226-232.

Ross, T. y Sumner, J. (2002). A simple, spreadsheet-based, food safety risk assessment tool. *International Journal of Food Microbiology*, 77, pp: 39-53.

Schwerer, B. (2002). Antibodies against gangliosides: a link between preceding infection and immunopathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *Microbes and Infection*, 4, pp: 373-384.

Sears, A., Baker, M.G., Wilson, N., Marshall, J., Muellner, P., Campbell, D.M., Lake, R.J. y French, N.P. (2011). Marked Campylobacteriosis decline after interventions aimed at poultry, New Zealand. *Emerging Infectious Diseases*, 17, pp: 1007-1015.

Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P.A. y Texeira, P. (2012). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*, 2, pp: 1-12.

Smiyh, J.L. (1995). Arthritis, Guillain-Barré syndrome, and other sequelae of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Journal of Food Protection*, 58, pp: 1153-1170.

Snelling, W.J., Stern, N.J., Lowery, C.J., Moore, J.E., Gibbons, E., Baker, C. y Dooley, J.S.G. (2008). Colonization of broilers by *Campylobacter jejuni* internalized within *Acanthamoeba castellanii*. *Archives of Microbiology*, 189, pp: 175-179.

Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E. y Seal, B.S. (2006). Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 50, pp: 3111-3116.

Strachan, N.J.C. y Forbes, K.J. (2010). The growing UK epidemic of human campylobacteriosis. *The Lancet*, 376, pp: 665-666.

Takahashi, M., Koga, M. Yokoyama, K. y Yuki, N. (2005). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barré and Fisher syndromes in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, pp: 335-339.

UE (2004). Reglamento (CE) Nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen nomas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. DO L 139 de 30 de abril de 2004, pp: 1-155.

UE (2009). Decisión del Consejo de 18 de diciembre de 2008 por la que se rechaza la propuesta anunciada por la Comisión de un Reglamento del Consejo que desarrolla el Reglamento (CE) Nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la utilización de sustancias antimicrobianas para eliminar la contaminación microbiana de las canales de aves de corral (2009/121/CE). DO L 42 de 13 de febrero de 2009, pp: 1-3.

Van Vlirt, A.H.M. y Ketley, J.M. (2001). Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 90, pp: 45S-56S.

Vose Consulting (2011). A quantitative microbiological risk assessment of *Campylobacter* in the broiler meat chain. Vose Consulting (US) LLC, USA, pp: 1-71.

Waldenstrom, J., Broman, T., Carlsson, I., Hasselquist, D., Achterberg, R.P., Wagenaar, J.A. y Olsen, B. (2002). Preva-

lence of *Campylobacter jejuni, Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp: 5911-5917.

Wassenaar, T.M. y Blaser, M.J. (1999). Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes and Infection*, 1, pp: 1023-1033.

Wassenaar, T.M. (2011). Following an imaginary *Campylobacter* population from farm to fork and beyond: a bacterial perspective. *Letters in Applied Microbiology*, 53, pp: 253-263.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre riesgos microbiológicos asociados al consumo de frutos obtenidos de *Fragaria* spp. y *Rubus* spp.

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, María Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, Mª 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, Mª Carmen Vidal Carou

Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2012-006

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 19 de septiembre de 2012

Grupo de Trabajo

Alberto Cepeda Sáez (Coordinador)

Antonio Herrera Marteache

Mª Rosario Martín de Santos

Antonio Martínez López

Rosa María Pintó Solé

José Manuel Miranda López (Consultor externo)

Resumen

El consumo y como consecuencia de ello, la producción mundial de frutos obtenidos de *Fragaria* spp. (como fresas y fresones) y *Rubus* spp. (como frambuesas o zarzamoras) ha experimentado un importante aumento a nivel mundial en los últimos años. España es además uno de los mayores países productores de frutas procedentes de estas especies vegetales, principalmente las fresas y las frambuesas. Por ello, es de gran relevancia conocer los riesgos microbiológicos asociados al consumo de estas frutas, así como las posibles medidas de prevención para evitar la aparición de dichos brotes.

Hasta la actualidad, este tipo de frutas han causado brotes alimentarios fundamentalmente debido a la presencia en los mismos de agentes víricos (como pueden ser el norovirus y virus de la hepatitis A) o parasitarios (especialmente por *Cyclospora cayetanensis*), mientras que sólo se ha documentado un brote causado por *Escherichia coli* O157:H7.

Dado lo heterogéneo de los microorganismos patógenos potencialmente contaminantes de estos productos, y el hecho de que normalmente se consuman crudos o mínimamente procesados, hace difícil establecer protocolos de desinfección que aseguren la inocuidad de los mismos. Por este motivo, a fin de mantener la seguridad alimentaria es imprescindible extremar, especialmente en aquellas frutas que se cultivan a nivel de tierra, las buenas prácticas higiénicas en su cultivo y recolección. Asimismo, es necesario mantener un sistema de trazabilidad protocolizado y a poder ser aceptado internacionalmente que permita determinar rápidamente el agente causal en el caso de la aparición de un brote producido como consecuencia del consumo de estas frutas.

Palabras clave

Riesgo microbiológico, prevención, desinfección, brote alimentario, fresas, frambuesas, zarzamoras, norovirus, virus hepatitis A, *Cyclospora cayetanensis, Escherichia coli* O157:H7.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to the microbiological risks associated with the consumption of fruits obtained from *Fragaria* spp. and *Rubus* spp.

Abstract

The consumption and as a result, the world production of fruits obtained from *Fragaria* spp. (such as strawberries) or *Rubus* spp. (such as raspberries or blackberries) has significantly increased worldwide in recent years. Spain is one of the largest producers of fruits from these plants, such as strawberries and raspberries. It is therefore of great relevance to know the microbiological risks associated with the consumption of these fruits, as well as the possible preventive measures to avoid the occurrence of outbreaks derived from berries intake.

To the present, these fruits have caused outbreaks mainly due to the presence of viral agents (especially norovirus and hepatitis A) and parasites (especially *Cyclospora cayetanensis*), whereas in the case of bacterial pathogens it has only been documented one outbreak caused by *Escherichia coli* O157:H7.

Given the heterogeneity of potentially contaminating pathogens in these products, and the fact that they are usually eaten raw or minimally processed, it is difficult to establish disinfection protocols to ensure their safety. For this reason, in order to maintain food security it is essential to maximize the good hygienic practices in cultivation and harvesting, especially in fruits cultivated at ground level. It is also necessary to maintain a standardized and internationally accepted traceability system that allows a rapid identification of the causing agent when an outbreak caused by the consumption of these fruits occurs.

Key words

Microbiological risk, prevention, disinfection, foodborne outbreak, strawberries, raspberries, blackberries, norovirus, hepatitis A virus, *Cyclospora cayetanensis, Escherichia coli* O157:H7.

Introducción

En los últimos años, el consumo *per cápita* de frutas y verduras en los países desarrollados ha experimentado un importante incremento (Lynch et al., 2009), en gran parte debido a las recomendaciones de los expertos en nutrición, que aconsejan aumentar el consumo de estos alimentos. Dichas recomendaciones, plasmadas en algunas pirámides nutricionales donde establecen el consumo de cinco porciones de frutas y verduras diarias, tienen su origen en una ingesta insuficiente de dichos alimentos en los países occidentales (OMS, 2003). Como es conocido, estos alimentos juegan un papel fundamental en la prevención de enfermedades muy comunes en nuestra época, como son las enfermedades cardiovasculares, las metabólicas como la obesidad o la diabetes y diversos tipos de cáncer (Johnson et al., 2004). Este efecto preventivo se debe tanto al aporte de fibra como al de numerosas sustancias bioactivas y antioxidantes (Arancibia-Avila et al., 2012). Por estos motivos, los consumidores perciben estos alimentos como sanos y saludables, pero a menudo no son conscientes de los riesgos derivados de la presencia en los mismos de patógenos alimentarios que pueden llegar a representar.

De este modo, las frutas, verduras y hortalizas frescas se encuentran cada vez más implicados en la aparición de brotes alimentarios. Tanto es así que en Estados Unidos, la proporción de brotes alimentarios en los cuales los vegetales se han identificado como el agente causal ha pasado de menos del 1% en los años 70 hasta más de un 6% en los años 90 (Sivapalasingam et al., 2004). En Australia, las verduras y hortalizas frescas causaron el 4% de todos los brotes alimentarios notificados entre los años 2001 y 2005 (Kirk et al., 2008).

Este incremento puede atribuirse a la combinación de múltiples factores. Además del ya mencionado incremento en el consumo *per cápita* de frutas y verduras frescas, existen otros factores importantes que a menudo se relacionan con la aparición de intoxicaciones alimentarias causadas por el consumo de frutas y verduras. Entre estas causas, puede mencionarse el uso en algunos países productores de agentes contaminantes (como estiércol o aguas residuales). Otro factor importante es la cada vez mayor distancia y duración del transporte desde el lugar de origen al de consumo, que aumenta la probabilidad de contaminación y/o proliferación de los microorganismos contaminantes durante el mismo. Cabe mencionar también el hecho de que este tipo de alimentos se consume habitualmente crudo y que el lavado de los mismos antes de su consumo puede no ser una medida eficaz para eliminar la presencia de microorganismos patógenos (Burnett y Beuchat, 2001). También es importante el hecho de que cada vez existe una mayor tendencia a la comercialización de estos productos troceados o con tratamientos físicos que eliminan o reducen la protección que ofrece la cubierta vegetal. El corte o rotura de la cubierta vegetal provoca la salida de nutrientes del interior del vegetal que posteriormente pueden favorecer la multiplicación bacteriana, siendo así estos productos más perecederos.

Más concretamente, dentro de las frutas y verduras, el consumo de frutos obtenidos de *Fragaria* spp. (como fresas y fresones) y *Rubus* spp. (como frambuesas o zarzamoras) ha experimentado en los últimos años un importante aumento a nivel mundial, lo que ha llevado a que su producción mundial alcanzase según la FAO *(Food and Agriculture Organization)* en el año 2009 las 311.959 tm en el caso de los arándanos/mirtilos, 409.707 tm en el caso de los arándanos rojos, 486.889 tm en el caso de las frambuesas y 4.178.152 tm en el caso de las fresas. En España, es especialmente relevante la importancia de las fresas, ya que según el FAOstat, se trata (junto con Estados Unidos y Egipto) de

uno de los principales exportadores mundiales de fresas, y también de frambuesas, de las que España también es uno de los principales productores mundiales (junto con Serbia y Polonia) (Comisión del *Codex Alimentarius*, 2011).

Por todo ello, la Dirección Ejecutiva de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha solicitado al Comité Científico la elaboración de un informe con relación a los riesgos microbiológicos asociados al consumo de este tipo de productos.

Factores epidemiológicos que favorecen la aparición de brotes causados por productos vegetales

En la cadena que va desde la granja a la mesa, existen numerosos factores que pueden intervenir de manera decisiva en la seguridad microbiológica de las frutas y verduras frescas. Así, factores externos como el ambiente en el que las plantas crecen, la localización geográfica, el tipo de riego, las especies de fauna autóctona en contacto con las frutas y verduras o el modo de cosechado juegan un papel muy importante en el tipo y cantidad de microorganismos que se van a encontrar en la superficie externa de los productos vegetales (Brackett, 1999). Por otra parte, ciertos parámetros intrínsecos como la naturaleza del epitelio vegetal y su cubierta protectora, el pH interior de la planta, y la presencia de sustancias naturales con potencial efecto antimicrobiano condicionan la cantidad y diversidad de microbiota endógena (Burnett y Beuchat, 2001). No obstante, los puntos de la cadena alimentaria que entrañan un mayor riesgo de contaminación por agentes patógenos son el cultivo de las frutas y verduras, su procesamiento inicial y la preparación gastronómica final de los mismos (Lynch et al., 2009).

Trabajos recientes indican que las conexiones entre las bacterias patógenas que pueden contaminar los alimentos y los productos vegetales pueden ser más complicadas que la simple transferencia pasiva (Tyler y Triplett, 2008). De este modo, a pesar de que las bacterias patógenas están bien adaptadas para sobrevivir en el intestino de los animales vertebrados, también son capaces de sobrevivir y proliferar con cierta facilidad en algunos tipos de plantas. Este es el caso de patógenos como *Salmonella*, que pueden persistir durante semanas en la superficie vegetal (Lynch et al., 2009). Las bacterias patógenas, así como algunos virus, pueden localizarse en el interior de las plantas básicamente tras penetrar por la raíz (Hirneisen et al., 2012), y una vez se encuentran en el interior no les afecta ni el lavado ni la desinfección superficial. De este modo, pueden difundir por capilaridad a todas las partes de la planta. En lo referente a la contaminación durante la etapa de producción puede producirse una contaminación directa a través de las manos de los manipuladores si éstas no se han lavado correctamente.

Numerosos autores han señalado que el riesgo más importante en la epidemiología de los brotes alimentarios causados por productos vegetales es una temperatura de almacenamiento inadecuada (Brackett, 1999) (Burnett y Beuchat, 2001). Especialmente en el caso de los productos importados desde países terceros, en los cuales el transporte requiere mucho tiempo debido a su lejanía, una temperatura inadecuada favorece tanto el deterioro de los productos como la proliferación de bacterias patógenas que a menudo no son propias de nuestra zona geográfica, lo que dificulta el diagnóstico en caso de producirse un brote alimentario (Beuchat, 1998). La proliferación de virus y parásitos no es crítica puesto que son partículas inertes fuera de su hospedador. No obstante, aún en el caso de dichos agentes, la producción en países terceros, muy alejados geográficamente, dificulta el diagnóstico y

establecimiento del origen en caso de producirse un brote alimentario. Este hecho se debe a la inexistencia en algunos países de un sistema fiable de trazabilidad y/o un sistema rápido de alerta como los existentes en la Unión Europea.

Otro factor importante de riesgo es un lavado y/o desinfección superficial poco eficaz. Como norma general, el lavado de frutas y verduras reduce de manera significativa la contaminación microbiana superficial y de este modo prolonga la vida útil de las mismas y potencia su seguridad alimentaria. No obstante, debe tenerse en cuenta que mediante el lavado sólo se elimina una porción de la microbiota existente (Burnett y Beuchat, 2001) y que no es igual de efectivo para todos los agentes patógenos.

Existe también un importante factor epidemiológico típico de los países industrializados: el paulatino envejecimiento de la población. Cada vez la edad media de la población es mayor, lo que lleva asociado un mayor número de personas con enfermedades crónicas e inmunodeprimidas, que pueden sufrir intoxicaciones alimentarias causadas por agentes que no serían patógenos para personas jóvenes y sanas (Beuchat, 1998).

Agentes patógenos causantes de brotes alimentarios asociados al consumo de frutos de *Fragaria* spp. y *Rubus* spp.

Los frutos de *Fragaria* spp. y *Rubus* spp. se han señalado como alimentos involucrados en la aparición de brotes de gastroenteritis vírica y también de hepatitis A (Butot et al., 2009). También se han asociado a brotes causados por *E. coli* O157:H7 (CDC, 2006) y protozoarios (Cáceres et al., 1998) (Ho et al., 2002). Recientemente, en Europa se produjeron varios brotes alimentarios causados por norovirus a través del consumo de frambuesas congeladas importadas de Polonia, que en conjunto afectaron a más de 1.100 personas (Butot et al., 2007). Tal y como se puede observar en la Tabla 1, los brotes alimentarios de los cuales se tiene constancia causados por el consumo de fresas y frambuesas han sido provocados principalmente por agentes víricos y por protozoos.

Tabla 1. Brotes alimentarios documentados causados por el consumo de frutos de *Fragaria* spp. y *Rubus* spp.

Alimento implicado	Agente infeccioso	País	Referencia
Mezcla de frutas	Virus hepatitis A	Canadá	(CFIA, 2012)*
Frambuesas	Virus hepatitis A	Reino Unido	(Ramsay y Upton, 1989)
Fresas	Virus hepatitis A	Estados Unidos	(Niu et al., 1992)
Fresas	Virus hepatitis A	Estados Unidos	(Hutin, 1997)
Fresas	Virus hepatitis A	Estados Unidos	(Hutin et al., 1999)
Arándanos	Virus hepatitis A	Nueva Zelanda	(Calder et al., 2003)
Zarzamoras	Norovirus	Alemania	(Fell et al., 2007)
Frambuesas	Norovirus	Finlandia	(Sarvikivi et al., 2012)
Frambuesas	Norovirus	Europa-varios países	(Butot et al., 2007)
Frambuesas	Norovirus	Suecia	(Hjertqvist et al., 2006)
Frambuesas	Norovirus	Francia	(Cotterelle et al., 2005)
Frambuesas	Norovirus	Dinamarca	(Korsager et al., 2005)
Frambuesas	Norovirus	Suecia	(Le Guyader et al., 2004)
Frambuesas	Calicivirus	Finlandia	(Ponka et al., 1999)
Frambuesas	*Cyclospora cayetanensis*	Estados Unidos	(Herwaldt y Ackers, 1997)
Frambuesas	*Cyclospora cayetanensis*	Estados Unidos	(Herwaldt y Beach, 1999)
Frambuesas	*Cyclospora cayetanensis*	Estados Unidos	(Ho et al., 2002)
Frambuesas	*Cyclospora cayetanensis*	Estados Unidos	(Cáceres et al., 1998)
Fresas	*Escherichia coli* O157:H7	Estados Unidos	(CDC, 2006)

*No se llegó a confirmar el brote pero se retiraron las bayas del mercado por estar contaminadas.

Aunque a día de hoy sólo se conoce un caso de brote causado por patógenos bacterianos como consecuencia del consumo de fresas y frambuesas, el riesgo de que esto ocurra no debe minimizarse, ya que las vías de contaminación de estas frutas por virus entéricos y por patógenos bacterianos como *Salmonella* o *Escherichia coli* O157:H7 son, en términos globales, las mismas (Bialka y Demirci, 2008). Además trabajos experimentales han demostrado que tanto *Salmonella* como *Escherichia coli* O157:H7 pueden sobrevivir en la superficie de fresas durante al menos siete días (Knudsen et al., 2001). Cabe destacar, sin embargo, que la supervivencia del virus de la hepatitis A en superficies inertes no porosas es de hasta 60 días y en superficies porosas de hasta 30 días (Abad et al., 1994). Aunque no existen datos de su supervivencia en fresas u otras frutas similares sin procesar, se estima que pueda ser bastante más elevada que la de las mencionadas bacterias, lo cual podría contribuir a su mayor incidencia en brotes transmitidos por estos alimentos. El principal reservorio de *Escherichia coli* O157:H7 es el ganado vacuno (Doyle et al., 1997), por lo que es un riesgo para aquellas bayas que se cultivan a nivel del suelo, a las que puede acceder a través de la fertilización con estiércol no tratado o a través de aguas de riego contaminadas. Adicionalmente, tampoco debe descartarse que en el futuro se produzcan intoxicaciones causadas por otras especies bacterianas como *Listeria monocytogenes* o *Bacillus cereus*, que a pesar de no tener constancia de que hayan causado ningún brote a través de la ingestión de este tipo de frutas, si lo han provocado tras la ingestión de otros tipos de vegetales frescos (Beuchat, 1998).

En el caso de la contaminación vírica, además de la causada por el contacto con heces portadoras de virus, las personas que presentan vómitos pueden ser una importante fuente de contaminación si no extreman las medidas higiénicas. Dichas medidas incluyen no sólo la limpieza de las manos, sino también la de las superficies y utensilios potencialmente contaminados por los aerosoles que se originan con los vómitos, puesto que contienen grandes concentraciones víricas, en especial en el caso de infecciones por norovirus (Widdowson et al., 2005). Cabe además añadir que las medidas higiénicas deben ser permanentes y no sólo en etapas de infección reconocida puesto que existen muchos casos de portadores asintomáticos e incluso en el caso particular del virus de la hepatitis A la excreción del virus en las heces es máxima cuando todavía no se han manifestado los síntomas de la enfermedad (Pintó et al., 2012). Como se puede observar en la Tabla 1, los virus que más frecuentemente se han identificado como el agente causal de brotes derivados de la ingesta de fresas y frambuesas, son el virus de la hepatitis A y norovirus. A diferencia de los agentes bacterianos, los virus entéricos no se pueden multiplicar en el interior o sobre los vegetales y éstos sólo pueden servir como vehículo de transmisión (Beuchat, 1998). Los tratamientos desinfectantes comúnmente aplicados a las fresas y frambuesas suelen ser insuficientes para eliminar o inactivar los virus entéricos (Butot et al., 2008). El hecho de que algunos de los brotes víricos incluidos en la Tabla 1 se hayan producido como consecuencia del consumo de productos congelados durante varios meses, demuestra claramente que la congelación no inactiva dichos virus (Falkenhorst et al., 2005) (Butot et al., 2008). Más bien al contrario la congelación, y cuanto más baja la temperatura mejor, es el mejor método para preservar la infectividad de los virus desnudos.

La contaminación por protozoos ocurre normalmente a través del agua de riego o por contacto con heces, ya sea estiércol, heces humanas o heces de animales domésticos. Establecer normas generales respecto a estos agentes es complejo, ya que los ciclos de cada parásito difieren entre sí, por lo que las rutas necesarias para llegar a infestar a las personas a través de las fresas o frambuesas no son fácilmente estandarizables. Habitualmente, los protozoos llegan a la superficie vegetal a través de aguas superficiales empleadas en el riego o por contacto con estiércol en aquellos países en los que se usa como fertilizante (Beuchat, 1998). También es un factor importante a tener en cuenta el hecho de que debido a que algunos variedades de estas frutas se cultivan en climas tropicales, a través de su consumo podemos exponernos a enfermedades propias de este clima (Nóbrega et al., 2009).

Prevención de brotes provocados por frutos de *Fragaria* spp. y *Rubus* spp.

Es importante tener en cuenta que ninguno de los tratamientos que actualmente se utilizan en la desinfección de las frutas, es totalmente efectivo para la eliminación de todos los patógenos mencionados en la Tabla 1. Ello se debe a que dichos tratamientos están principalmente diseñados para la eliminación bacteriana y en general, tanto virus como parásitos son más resistentes que las bacterias. Por este motivo, las medidas preventivas más eficaces para evitar la aparición de brotes alimentarios como consecuencia del consumo de este tipo de frutas deben estar orientadas a evitar o minimizar el riesgo de que los agentes patógenos causantes de brotes puedan contaminar dichas frutas a lo largo de la cadena que va de la granja a la mesa.

Aún así, es importante señalar que algunos desinfectantes o tratamientos desinfectantes sí tienen cierta actividad frente a estos agentes patógenos. En el caso de los patógenos bacterianos, existe una

mayor variedad de agentes químicos que pueden ser utilizados para su desinfección, tales como compuestos clorados, yodados, ácidos orgánicos o compuestos de amonio cuaternario. Mediante el uso de estos agentes desinfectantes, se puede incrementar hasta 100 veces la eficacia del lavado para reducir la contaminación bacteriana superficial (Beuchat, 1998). No obstante, aún con el empleo de agentes desinfectantes la eliminación de la microbiota superficial no es completa. Existen patógenos que son resistentes a los desinfectantes empleados (por ejemplo *Listeria monocytogenes* es mucho más resistente a los desinfectantes clorados que *Salmonella*), y además existen zonas concretas de la epidermis vegetal que presentan una estructura morfológica hidrófoba, a las cuales el desinfectante no puede acceder (Burnett y Beuchat, 2001). Esto ocurrirá en mayor medida, todavía, si el agente microbiano no se encuentra en la superficie vegetal, sino en el interior de los tejidos, a los cuales puede acceder a través de roturas en la epidermis vegetal o a través de la raíz.

La desinfección con compuestos de amonio cuaternario o HCl a concentraciones (1:100) se considera también efectiva en la inactivación del virus de la hepatitis A (Fiore, 2004). También se ha considerado una buena opción para la eliminación de algunos tipos de virus el uso de compuestos fenólicos a concentraciones altas (Gulati et al., 2001). No obstante, este uso sólo debe considerarse para la desinfección de las superficies de instrumental, ya que altera de manera importante las características organolépticas de las frutas frescas. Así pues, a pesar de algunas excepciones, de manera general la efectividad de los agentes desinfectantes clásicos no es buena para la eliminación de virus ni de ooquistes de protozoos (Beuchat, 1998). Esto hace necesario considerar otras opciones más efectivas contra los agentes que de manera más habitual están involucrados en la aparición de brotes alimentarios consecuencia de la ingesta de este tipo de frutas.

Agentes que han demostrado tener efectividad contra los virus entéricos y los oocistos/ooquistes de algunos protozoos como *Cryptosporium parvum* o *Giardia* son el ozono y el dióxido de cloro, gracias a su potente acción oxidante (Peeters et al., 1989). Por este motivo, algunos autores han propuesto el uso de agua ozonizada a concentraciones de 2-3 ppm para la desinfección de fresas y frambuesas (Beuchat, 1998).

También se ha demostrado que la irradiación presenta actividad frente a los agentes parasitarios (Loaharanu y Murrell, 1994), así como para la inactivación de virus entéricos. No obstante, la dosis de radiación necesaria para conseguir la eliminación de dichos virus entéricos es alta y por lo que se desaconseja su uso en alimentos (Mallet et al., 1991).

Otros autores han señalado como alternativas la utilización de métodos físicos, como los tratamientos térmicos o la liofilización al vacío (Butot et al., 2009). Estos métodos son especialmente interesantes para aquellas frutas que no se van a consumir en fresco o como ingredientes de alimentos mínimamente procesados, ya que presentan una actividad importante frente a contaminantes bacterianos, víricos y protozoarios. A pesar de que los virus pueden permanecer infectivos largos períodos de tiempo (más de un mes) en el exterior a temperatura ambiente, el calentamiento de los alimentos a temperaturas superiores a los 85 ºC durante un minuto es efectivo para la inactivación del algunos virus como el de la hepatitis A (Fiore, 2004). Sin embargo, cabe destacar que algunos virus entéricos, como el virus de la hepatitis A, resisten perfectamente bien la desecación (Abad et al., 1994). Por lo tanto la desecación de fresas, frambuesas y otras frutas como método para inactivar virus no ofrece garantías.

Con respecto a los ooquistes de protozoos, se ha demostrado que los de *Cyclospora cayetanensis* no pueden esporular tras haber sido sometidos a congelación a -18 ºC durante 24 horas, ni después de ser calentados a 60 ºC durante una hora (Sterling y Ortega, 1999). Los ooquistes de este protozoo son también muy sensibles a la desecación, de forma que sus paredes no resisten más de 15 minutos en ambiente seco (Chacín-Bonilla y Barrios, 2011), lo cual hace muy improbable que estos ooquistes puedan ser transmitidos por fresas o frambuesas u otras frutas desecadas o liofilizadas.

Existen también métodos físicos como el uso de altas presiones, eficaz tanto contra los contaminantes bacterianos como contra virus, como el de la hepatitis A (Fiore, 2004). No obstante esta metodología, además de tener un coste elevado, es útil para zumos, mermeladas o gelatinas pero no para frutas frescas, ya que daña sus tejidos (Malinowska-Panczyk y Kolodziejska, 2010). Otra opción la constituye el uso de pulsos de luz ultravioleta (Bialka y Demirci, 2008), que muestran niveles de actividad similares a los desinfectantes más efectivos, al menos para la eliminación de patógenos bacterianos como *Salmonella* o *Escherichia coli* O157:H7. Este procedimiento también se ha mostrado eficaz para la eliminación de hongos en la superficie de frambuesas (Lagunas-Solar et al., 2006).

Así pues, teniendo en cuenta que no existe un único método de desinfección que sea eficaz frente a todos los tipos de potenciales patógenos, deben considerarse cruciales para la prevención de los brotes alimentarios producidos por frutos obtenidos de *Fragaria* spp. y *Rubus* spp. las medidas profilácticas encaminadas a evitar la contaminación de las mismas. Para ello juegan un papel importante factores relacionados con el crecimiento de las plantas, su procesado, el transporte y la preparación culinaria. En concreto, son de especial relevancia los siguientes aspectos:

1. La calidad del agua. El agua utilizada en el riego como soporte para la aplicación de tratamientos a las plantas, o en el lavado de los productos tras su recolección, puede ser una importante fuente de contaminación tanto bacteriana como vírica o protozoaria. Asimismo también es muy importante el sistema de riego empleado, ya que a diferencia del riego por aspersión, que moja toda la planta, incluidas las frutas, el riego por goteo evita el contacto del agua regante con dicha fruta.
2. Aislamiento de la materia fecal. Es muy importante aislar las frutas y verduras tanto del estiércol, como de las heces de animales domésticos, silvestres o de las heces humanas. Para ello es esencial que especialmente en aquellos tipos de plantas cuyas frutas se encuentren cerca del suelo, se establezcan barreras físicas que impidan el contacto con el mismo, como por ejemplo plásticos. En el caso de que exista riesgo de que las frutas hayan podido estar en contacto con materia fecal, es muy importante no utilizarlas para trocear, pelar, cortar o utilizar como ingrediente en cualquier alimento mínimamente procesado, ya que el riesgo para los consumidores aumentaría significativa.
3. Correcto lavado y desinfectado. Tanto el lavado como la desinfección de las frutas y verduras reduce la carga microbiana superficial de las mismas. No obstante, aún en el caso de los patógenos bacterianos, estas medidas preventivas no son totalmente eficaces en la eliminación de los mismos, especialmente si se encuentran en el interior de los productos. Se debe tener presente además que tal y como ya se ha mencionado, los protozoos y virus son generalmente resistentes a los agentes desinfectantes empleados, por lo que el lavado de desinfección de estas frutas sólo contribuye a reducir la contaminación superficial. Es importante también tener en cuenta que la

superficie de las fresas, frambuesas, zarzamoras, etc., no es lisa, que presentan en sus superficies estructuras morfológicas hidrófobas que dificultan el acceso del agua de lavado y el desinfectante empleado.

4. Almacenamiento a temperaturas correctas. Un almacenamiento a temperaturas suaves y adecuadas a la especie vegetal concreta reduce la velocidad de deterioro de los vegetales y la de proliferación de las posibles bacterias contaminantes que se encuentren en él. Se deben adoptar especiales precauciones en aquellos productos cortados o mondados en los cuales se haya modificado la cubierta vegetal externa, lo cual favorece la contaminación bacteriana. Con carácter general, en los productos cortados, mondados o pelados se debe considerar su transporte y almacenamiento en refrigeración.
5. Buenas prácticas higiénicas por parte de los manipuladores. Una correcta higiene, en especial de las manos de los manipuladores es crucial para reducir la aparición de brotes alimentarios. Además hay que tener en cuenta que existen portadores asintomáticos de *Salmonella*, norovirus o virus de la hepatitis A. De hecho en este último caso la excreción del virus en las heces es máxima cuando todavía no se han manifestado los síntomas de la enfermedad evidenciando que las medidas higiénicas deben ser permanentes y no sólo en etapas de infección reconocida.
6. Impedir el acceso de animales e insectos a los frutos mencionados, en especial a aquellos que ya se han lavado y/o desinfectado. Para ello es muy importante el uso de envases aislantes durante la comercialización y tener especial cuidado durante la producción, en aquellos casos como la fresa que se cultivan al nivel del suelo.

Conclusiones del Comité Científico

Dadas las circunstancias epidemiológicas y las particularidades de la producción de frutos obtenidos de *Fragaria* spp. y *Rubus* spp., muchos de los cuales se producen en países que en algunos casos presentan elevadas prevalencias de enfermedades víricas o parasitarias, es previsible que el número de brotes provocados por estas frutas continúe aumentando en los próximos años si no se adoptan medidas específicas para su prevención.

Dichas frutas, debido a su elevada actividad del agua y su superficie rugosa, son alimentos propensos para que en ellos proliferen bacterias patógenas, por lo que un lavado y desinfección adecuado es recomendable. Teniendo en cuenta además la alta supervivencia de los virus entéricos y parásitos que han dado lugar a brotes documentados provocados por el consumo de estas frutas, sería conveniente complementar dicho lavado y desinfección con tratamientos que sean capaces de al menos reducir la carga de virus y protozoos, como podría ser el lavado con agua ozonizada o con dióxido de cloro. Otras opciones interesantes a considerar serían la irradiación de aquellas frutas que procedan de zonas en las cuales es más frecuente la presencia de norovirus o virus de la hepatitis A, o la congelación de aquellas que procedan de países en los cuales la presencia de *Cyclospora cayetanensis* es enzoótica.

Dada la dificultad para eliminar virus y protozoos de la superficie de los frutos obtenidos de *Fragaria* spp. y *Rubus* spp., parece adecuado hacer especial énfasis en potenciar las buenas prácticas higiénicas durante la producción para evitar la contaminación de los mismos. En este sentido, es especialmente importante prevenir el contacto con heces o estiércol sin tratar, el uso de barreras físicas que separen

el fruto del suelo, la utilización de agua potable para el riego y el lavado y la utilización de sistemas como el riego por goteo que eviten el contacto entre el agua de riego y la fruta. En el caso de las superficies e instrumental que entren en contacto con las frutas, es interesante la utilización de compuestos fenólicos a altas concentraciones y el uso de pulsos de luz ultravioleta.

Es indispensable diseñar un sistema de trazabilidad protocolizado, a ser posible aceptado internacionalmente, para que en aquéllos casos en los que se produzca un brote alimentario se pueda determinar rápidamente el agente causal y adoptar medidas correctoras adecuadas. Asimismo, es de vital importancia el contar con métodos rápidos y fiables de identificación de los principales agentes implicados en la aparición de brotes alimentarios como consecuencia del consumo de estas frutas, así como métodos de diagnóstico que permitan una respuesta rápida y adecuada en caso de producirse un brote.

Referencias

Abad, F.X., Pintó, R.M y Bosch, A. (1994) Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology* 60, pp: 3704-3710.

Arancibia-Avila, P., Namiesnik, J., Toledo, F., Werner, E., Martinez-Ayala, A.L., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A. y Gorinstein, S. (2012) The influence of different time durations of thermal processing in berries quality. *Food Control*, 26, pp: 587-593.

Beuchat, L.R. (1998) Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: A review. *Food Safety Unit*, WHO document 98.2.

Bialka, K.L. y Demirci, A. (2008) Efficacy of pulsed UV-light for the decontamination of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella spp. on raspberries and strawberries. *Journal of Food Science,* 73 (5), pp: M201-M207.

Brackett, R.E. (1999) Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens on produce. *Postharvest Biology and Technology,* 15, pp: 305-311.

Burnett, S.L. y Beuchat, L.R. (2001) Human pathogens associated with produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 27, pp: 104-110.

Butot, S., Putallaz, T. y Sánchez, G. (2007) Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology,* 73, pp: 186-192.

Butot, S., Putallaz, T. y Sánchez, G. (2008) Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *International Journal of Food Microbiology,* 126, pp: 30-35.

Butot, S., Putallaz, T., Amoroso, R. y Sánchez, G. (2009). Inactivation of enteric viruses in minimally processed berries and herbs. *Applied and Environmental Microbiology,* 75, pp: 4155-4161.

Cáceres, V.M., Ball, R.T., Somerfeldt, S.A., Mackey, R.L., Nichols, S.E., MacKenzie, W.R. y Herwaldt, B.L. (1998) A foodborne otbreak of cyclosporiasis caused by imported raspberries. *Journal of Family Practice,* 47, pp: 231-234.

Calder, L., Simmons, G., Thorley, C., Taylor, P., Pritchard, K., Greening, G. y Bishop, J. (2003). An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries. *Epidemiology and Infection,* 131, pp: 745-751.

CDC (2006) Centre for Disease Control and Prevention. Non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) outbreaks. CDC Foodborne Outbreak Online Database, USA.

CFIA (2012) Canadian Food Inspection Agency. Certain western family brand pomeberry blend berries may contain hepatitis A virus. *Health Hazard Alert.*

Chacín-Bonilla, L. y Barrios, F. (2011) *Cyclospora cayetanensis:* biología, distribución ambiental y transferencia. *Biomédica*, 31 (1), pp: 132-143.

Comisión del Codex Alimentarius (2011). Informe de la 43º reunión del comité del *Códex* sobre higiene de los alimentos. REP12/FH, pp: 93-96.

Cotterelle, B., Drougard, C., Rolland, J., Becharel, M., Boudon, M., Pinede, S., Traoré, O., Balay, K., Pothier, P. y Espié, E. (2005) Outbreak of norovirus infection associated with the consumption of frozen raspberries, France, March 2005. *EuroSurveillance,* 10 (17).

Doyle, M.P., Zhao, T., Meng, J. y Zhao, S. (1997) *Escherichia coli* O157:H7. En libro: *Food Microbiology: Fundamental and Frontiers.* Washington D.C. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J. American Society for Microbiology, pp: 171-191.

Falkenhorst, G., Krusell, L., Lisby, M., Madsen, S.B., Bottinger, B. y Molbak, K. (2005). Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005. *EuroSurveillance,* 10 (38).

Fell, G., Boyens, M. y Baumgarte, S. (2007). Frozen berries as a risk factor for outbreaks of norovirus gastroenteritis. Results of an outbreak investiga- tion in the summer of 2005 in Hamburg. *Bundesgesundheitsblatt–Gesundheits-forschung–Gesundheitsschutz,* 50(2), pp: 230-236.

Fiore, A.E. (2004). Hepatitis A transmitted by food. *Clinical Infectious Diseases,* 38, pp: 705-715.

Gulati, B.R., Allwood, P.B., Hedberg, C.W. y Goyal, S.M. (2001). Efficacy of commonly used disinfectants for the inactivation of calicivirus on strawberry, lettuce, and a food-contact surface. *Journal of Food Protection,* 64 (9), pp: 1430-1434.

Herwaldt, B.L. y Ackers, M.L. (1997). An outbreak in 1996 of cyclospororiasis associated with imported raspberries. *New England Journal of Medicine,* 336, pp: 1548-1556.

Herwaldt, B.L. y Beach, M.J. (1999). The return of Cyclospora in 1997: Another outbreak of cyclosporiasis in North America associated with imported raspberries. *Annals of Internal Medicine,* 130, pp: 1040-1057.

Hirneisen, K.A., Sharma, M. y Kniel, K.E. (2012). Human enteric pathogen internalization by root uptake into food crops. *Foodborne pathogens and disease,* 5, pp: 396-405.

Hjertqvist, M., Johansson, A., Svensson, N., Abom, P.E., Magnusson, C., Olsson, M., Hedlund, K.O. y Andersson, Y. (2006). Four outbreaks of norovirus gastroenteritis after consuming raspberries, Sweden, June-August 2006. *Euro Surveillance,* 11 (36).

Ho A.Y., López, A.S., Eberhart, M.G., Levenson, R., Finkel, B.S., da Silva, A.J., Roberts, J.M., Orlandi, P.A., Johnson, C.C. y Herwaldt, B.L. (2002). Outbreak of cyclosporiasis associated with imported raspberries, Philadelphia, Pennsylvania, 2000. *Emerging Infectious Diseases,* 8, pp: 783-788.

Hutin, Y. (1997). An outbreak of hepatitis A associated with frozen strawberries, Michigan, 1997. *American Journal of Epidemiology,* 145, pp: 345-345.

Hutin, Y.J.F., Pool, V., Cramer, E.H., Nainan, O.V., Weyh, J., Williams, I.T., Golstein, S.T., Gensheimer, K.F., Bell, B.P., Shapiro, C.N., Alter, M.J. y Margolis, H.S. (1999). A multistate, foodborne outbreak of hepatitis A. *New England Journal of Medicine,* 340 (8), pp: 595-602.

Johnson, D.B., Beaudouin, S., Smith, L.T., Beresford, S.A. y Logerfo, J.P. (2004). Increasing fruit and vegetable intake in home-bound elders: the Seattle senior farmer´s market nutrition pilot program. *Preventive Chronic Diseases,* 1, A03.

Kirk, M.D., Fullerton, K. y Gregory, J. (2008). Fresh produce outbreaks in Australia 2001-2006. En libro: 2008 *International Conference on Emerging Infections Diseases Program and Abstracts Book*. Atlanta, GA. Center for Disease Control and Prevention, pp: 49-50.

Knudsen, D.M., Yamamoto, S.A. y Harris, L.J. (2001). Survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on fresh and frozen strawberries. *Journal of Food Protection,* 64, pp: 1438-1488.

Korsager, B., Hede, S., Boggild, H., Bottiger, B. y Molbak, K. (2005). Two outbreaks of norovirus infections associated with the consumption of imported frozen raspberries, Denmark, May-June 2005. *EuroSurveillance* 10 (25).

Lagunas-Solar, M.C., Pina, C., MacDonald, J.D. y Bolkan, L. (2006). Development of pulsed UV light processes for surface disinfection of fresh fruits. *Journal of Food Protection,* 69, pp: 376-384.

Le Guyader, F.S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K.O., Alsterlund, R., Pommepuy, M. y Svensson, L. (2004). Detection of noroviruses in rapspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *International Journal of Food Microbiology,* 97, pp: 179-186.

Loaharanu, P. y Murrel, D. (1994). A role for irradiation in the control of foodborne parasites. *Trends in Food Science and Technology,* 5, pp: 190-195.

Lynch. M.F., Tauxe, R.V. y Hedberg, C.W. (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology and Infection,* 137, pp: 307-315.

Malinowska-Panczyk, E. y Kolodziejska, I. (2010). Possibilities of using high pressure in fruit and vegetable industry. *Zywnosc-Nauka Technologia Jakosc,* 17, pp: 5-15.

Mallet, J.C., Berghian, L.E., Metcalf, T.G. y Kaylor, J.D. (1991). Potential of irradiation technology for improving shellfish sanitation. *Journal of Food Safety,* 11, pp: 231-245.

Niu, M.T., Polish, L.B., Robertson, B.H., Khanna, B.K., Woodruff, B.A., Shapiro, C.N., Miller, M.A., Smith, J.D., Gedrose, J.K., Alter, M.J. y Margoles, H.S. (1992). Multistate outbreak of hepatitis A associated with frozen strawberries. *The Journal of Infectious Disease,* 166, pp: 518-524.

Nóbrega, A.A., García, M.H., Tattoo, E., Obara, M.T., Costa, E., Sobel, J. y Araujo. W.N. (2009) Oral transmission of chagas disease by consumption of Açaí palm fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases,* 15, pp: 653-655.

OMS (2003). Organización Mundial de la Salud. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva, Switzerland. *WHO Technical Report Series,* 916. Geneva, Switzerland.

Peeters, J.E., Mazas, E.A., Masschelein, W.J., de Maturana, I.V.M. y Debaker, E. (1989). Effect of disinfection of drinking-water with ozone and chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology,* 55, pp: 1519-1522.

Pintó, R.M., D'Andrea, L., Pérez-Rodríguez, F.J., Costafreda, M.I., Ribes, E., Guix, S. y Bosch, A. (2012). Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiology,* 7, pp: 341-346.

Ponka, A., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H. y Lyytikainen, O. (1999). An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries. *Epidemiology and Infection,* 123, pp: 469-474.

Ramsay, C.N. y Upton, P.A. (1989). Hepatitis a and frozen raspberries. *The Lancet,* 1, pp: 43-44.

Sarvikivi, E., Roivainen, M., Maunula, L., Niskanen, T., Korhonen, T., Lappalainen, M. y Kuusi, M. (2012) Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries. *Epidemiology and Infection,* 140, pp: 260-267.

Sivapalasingam, S., Friedman, C.R., Cohen, L. y Tauxe, R.V. (2004). Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the Unites States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection,* 67, pp: 2342-2353.

Sterling, C.R. y Ortega, Y.R. (1999). Cyclospora: An enigma worth unravelling. *Emerging Infectious Diseases,* 5, pp: 48-53.

Tyler, H.L. y Triplett, E.W. (2008). Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology,* 46, pp: 53-73.

Widdowson, M.A., Sulka, A., Bulens, S.N., Beard, R.S., Chaves, S.S., Hammond, R., Salehi, E.D.P., Swanson, E., Totaro, J., Woron, R., Mead, P.S., Bresee, J.S., Monroe, S.S. y Glass, R.I. (2005). Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerging Infectious Diseases,* 11, pp: 104-110.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicos/productores de toxinas Shiga/enterohemorrágicos (VTEC/STEC/EHEC)

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, María Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, Mª 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, Mª Carmen Vidal Carou

Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2012-007

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 19 de septiembre de 2012

Grupo de Trabajo

Antonio Martínez López (Coordinador)
Alberto Cepeda Sáez
Antonio Herrera Marteache
Mª Rosario Martín de Santos

Expertos del LREC-USC

Azucena Mora, Alexandra Herrera, Cecilia López
Ghizlane Dahbi, Miguel Blanco, Jorge Blanco

Resumen

Escherichia coli es la especie predominante de la microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo en muchas especies de animales y se elimina por las heces al exterior. Se puede encontrar en el medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento en los mismos es un indicador de contaminación fecal. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales e incluso beneficiosas, algunas son patógenas y pueden producir importantes infecciones entéricas (diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico) o extraintestinales (infecciones del tracto urinario, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis, e infecciones respiratorias y de heridas) en seres humanos y animales.

El grupo de los *E. coli* verotoxigénicos (VTEC), también denominados productores de toxinas Shiga (STEC) y enterohemorrágicos (EHEC), muy especialmente las cepas altamente virulentas del serotipo O157:H7, son patógenos importantes que causan patologías muy graves en seres humanos: colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH). Los rumiantes, especialmente el ganado vacuno, constituyen el principal reservorio de este tipo de microorganismos, siendo la carne picada, las hamburguesas y los vegetales que se consumen crudos o ligeramente cocinados los principales vehículos de transmisión.

En consecuencia, deben ponerse en marcha las medidas preventivas necesarias que cubran toda la cadena alimentaria: buenas prácticas agrícolas, programas de bioseguridad en explotaciones animales, buenas prácticas de higiene y de inspección en mataderos, buenas prácticas en el procesamiento de vegetales para consumo en fresco, incorporación por parte de los operadores de las industrias alimentarias de procedimientos permanentes basados en los principios del Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC), formación y educación de los consumidores en buenas prácticas de conservación y cocinado de los alimentos. Todas estas medidas deberían contribuir a minimizar la incidencia

de esta toxiinfección alimentaria en la población humana. Además, todo ello debería ir acompañado de protocolos de análisis específicos que permitan la detección rápida e inequívoca de las cepas implicadas, y muy especialmente de las altamente virulentas pertenecientes a los serotipos: O104:H4, O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, O121:H19 y O145:H-.

Palabras clave

E. coli enterohemorrágica, *E. coli* enteroagregativa, toxina Shiga, O104:H4, O157:H7.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on preventative measures and applicable recommendations for avoiding possible food-borne infections caused by strains of verotoxigenic/Shiga toxin-producing/enterohemorrhagic *Escherichia coli* (VTEC/STEC/EHEC).

Abstract

Escherichia coli is the predominant species of normal aerobic and facultative anaerobic microbiota found in the digestive tract of many species of animals, and it is expelled from the body through faeces. It can be found outside the body as it can survive for a certain period in water and in food. Its isolate in these elements is indicative of faecal contamination. Although most strains of *E. coli* are commensals and even beneficial, some are pathogens and can cause serious enteric infections (diarrhoea, hemorrhagic colitis, haemolytic uraemic syndrome) or extraintestinal infections (urinary tract infections, bacteraemia or septicaemia, meningitis, peritonitis, mastitis, and respiratory and wound infections) in humans and animals.

The verotoxigenic *E. coli* (VTEC) group, also known as Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), especially the highly virulent strains of the serotype O157:H7, is a dangerous group of pathogens which causes very serious diseases in human beings: hemorrhagic colitis (HC) and the haemolytic uraemic syndrome (HUS). Ruminants, especially cattle, are the main reservoir of this type of micro-organism, while the primary means of transmission are minced meat, hamburgers and vegetables which are consumed raw or lightly cooked.

The necessary preventative measures, covering the whole food chain, should consequently be put in place. These include: good farming practices, biosafety programmes in farms with livestock, good hygiene and abattoir inspection practices, and good practices in vegetable processing for fresh consumption. Also, workers in the food industry must adopt procedures based on the principles of Hazard Analysis & Critical Control Points (HACCP), and consumers must be taught the good practices of preserving and cooking food. All of these measures should help minimise the incidence of this food poisoning in human populations. These measures should, furthermore, be combined with specific analysis protocols which enable quick and accurate detection of the strains involved, and more specifically, the highly virulent strains belonging to the serotypes: O104:H4, O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, O121:H19 and O145:H-

Key words

E. coli enteroahemorragic, *E. coli* enteroaggregative, Shiga toxin, O104:H4, O157:H7.

Introducción

1. Fundamentos de la petición

Escherichia coli es una enterobacteria ubicua que forma parte, como especie predominante, de la microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo en la mayor parte de los mamíferos y las aves. *E. coli* se excreta con las heces de manera abundante, en un alto porcentaje sobrevive en el exterior, incluso durante largos períodos de tiempo. Por ese motivo, es posible su presencia en el medio ambiente, siendo por ello su aislamiento un indicador de contaminación fecal. Si bien la mayoría de las cepas de *E. coli* son miembros no patógenos de la microbiota intestinal, donde juega un papel inocuo o incluso beneficioso para el hospedador, algunas cepas son patógenas debido a la adquisición de factores de virulencia específicos que les confieren la capacidad de producir una amplia variedad de infecciones en seres humanos y animales, tanto de tipo entérico (diarreas, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y enfermedad de los edemas) como extraintestinales (infecciones del tracto urinario, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis, e infecciones respiratorias y de heridas).

En base a los mecanismos de patogénesis y los factores de virulencia que poseen los *E. coli* diarreagénicos se han englobado en seis grupos o categorías:

1. *Escherichia coli* enteropatogénicos (EPEC).
2. *Escherichia coli* enterotoxigénicos (ETEC).
3. *Escherichia coli* enteroinvasivos (EIEC).
4. *Escherichia coli* enterohemorrágicos, verotoxigénicos o productores de toxinas Shiga (EHEC/VTEC/STEC).
5. *Escherichia coli* enteroagregativos (EAEC).
6. *Escherichia coli* con adherencia difusa (DAEC).

El grupo de los EHEC/VTEC/STEC, es un grupo de cepas de *E. coli* capaces de producir toxinas, muy similares a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. En este grupo se han descrito dos tipos de toxinas: la toxina Shiga 1 (Stx1) o verotoxina 1 (VT1), que difiere de la verdadera toxina Shiga en uno a siete aminoácidos y la toxina Shiga 2 (Stx2) o verotoxina 2 (VT2), que comparte un 60% de homología con Stx1. A pesar de estas diferencias con la verdadera toxina Shiga (Stx) se consideran que todas las toxinas Stx1 y Stx2 pertenecen a la familia de las toxinas Shiga, de ahí la denominación de *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC). Las toxinas Stx activas pueden detectarse utilizando el test de toxicidad en células Vero, por lo que también se denomina a este grupo como *E. coli* verotoxigénicos o productores de verotoxinas (VTEC). Las toxinas Shiga (verotoxinas) de *E. coli* pueden producir diferentes cuadros sintomáticos en los seres humanos que varían desde diarrea leve a colitis hemorrágica (CH), puede progresar a síndrome urémico hemolítico (SUH) acompañado de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y fallo renal agudo grave. Este cuadro clínico es el que ha hecho que este grupo de *E. coli* se denominen a menudo *E. coli* enterohemorrágico (EHEC).

Los rumiantes han sido identificados como el principal reservorio de cepas de *E. coli* verotoxigénicas o productoras de toxinas Shiga (de aquí en adelante STEC). No obstante, aunque el ganado vacuno es, con toda probabilidad, la fuente más importante de infecciones humanas (carne y productos lácteos

de vacuno, vegetales y agua contaminados con heces de vacuno), los STEC se han aislado también del ganado ovino y caprino y también de rumiantes silvestres (corzos, ciervos, gamos). La materia fecal de los rumiantes está reconocida como la fuente última de un gran porcentaje de infecciones humanas por STEC. Ésta puede contaminar la carne durante el sacrificio en matadero, puede ser arrastrada a ríos, lagos o fuentes de agua de bebida, o puede depositarse en frutas y verduras por el uso de abonos orgánicos o por uso de agua de riego contaminada con aguas residuales. Algunos animales como insectos, aves, roedores y otros silvestres, pueden transportar esas bacterias desde las heces al agua de bebida y los alimentos. Además, las cepas STEC pueden ser ingeridas inconscientemente por las personas que interactúan o trabajan con animales.

Los seres humanos, por tanto, pueden infectarse a través del contacto directo con una persona infectada o un animal portador, o indirectamente a través del medio ambiente, alimento, agua de bebida o agua superficial que contenga material fecal contaminada con STEC de origen humano o animal. Por tanto, las medidas preventivas para evitar las infecciones por STEC deben ponerse en marcha a lo largo de toda la cadena alimentaria, mediante la adopción de buenas prácticas agrícolas, programas de bioseguridad en explotaciones animales, higiene en mataderos, formación y educación de manipuladores y consumidores, utilizando medidas de autocontrol y gestión de la seguridad alimentaria encaminadas al control de este agente de peligro. Además, todo ello debería ir acompañado de técnicas de análisis específicas que permitan la detección rápida e inequívoca de las cepas implicadas.

Aunque la red de Vigilancia Epidemiológica y de Control de Enfermedades Transmisibles en la Comunidad fue creada por la Decisión 2119/98/CE (UE, 1998), no es hasta la Decisión 2009/312/CE (UE, 2009), relativa a las redes especializadas de vigilancia de enfermedades transmisibles, cuando aparecen las infecciones por *E. coli* enterohemorrágico como enfermedad de transmisión alimentaria. A consecuencia de esta disposición, los datos de casos de infección por STEC en humanos deben notificarse trimestralmente al sistema de vigilancia europeo (TESSy), aunque es necesario tener en cuenta que la mayoría de los países se basan únicamente en la vigilancia del serogrupo O157. De acuerdo con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la vigilancia debería extenderse a otros serogrupos, principalmente O26, O103, O104, O111 y O145, que se han identificado como los más frecuentes en los análisis periódicos realizados en Europa.

El Reglamento (CE) Nº 2073/2005 (UE, 2005) y su modificación (Reglamento (CE) Nº 1441/2007) (UE, 2007), relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, ha establecido hasta el momento un criterio de seguridad alimentaria para *E. coli* en moluscos bivalvos vivos y equinodermos, tunicados y gasterópodos vivos, en su periodo de vida útil, *E. coli* es un microorganismo que también se emplea como criterio de higiene, como indicador de contaminación fecal y/o del nivel de higiene de los establecimientos de elaboración de diferentes categorías de productos alimenticios (frutas y hortalizas troceadas listas para el consumo, queso elaborado a base de leche o suero sometido a tratamiento térmico, mantequilla y nata elaboradas a partir de leche cruda o leche sometida a tratamiento térmico inferior a la pasteurización, carne picada, carne separada mecánicamente, preparados de carne, etc.); para ello se lleva a cabo un recuento en placa mediante método microbiológico validado (el Reglamento establece el método ISO de referencia para llevar a cabo los ensayos). Por otro lado, el punto 14 del Reglamento (CE) Nº 2073/2005 indica que es poco probable que la aplicación de

normas microbiológicas para STEC O157 en el producto final produzca reducciones significativas del riesgo asociado para los consumidores. No obstante, el establecimiento de directrices microbiológicas destinadas a reducir la contaminación fecal a lo largo de la cadena alimentaria puede contribuir a reducir los riesgos para la salud pública, incluidos los producidos por la presencia de STEC.

2. Términos de referencia

Se requiere que el Comité Científico realice una valoración al respecto de las posibles medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por *E. coli* y más concretamente por STEC.

Evaluación

1. Identificación del peligro

E. coli son bacilos cortos Gram negativos con forma de bastón, anaerobios facultativos, móviles por poseer flagelos perítricos y no forman esporas. Se desarrolla bien en medios ordinarios a temperaturas de 20 a 40 ºC y pH de 6 a 8. Es el habitante natural del intestino de mamíferos y aves, y se excreta diariamente con las heces de manera abundante y un alto porcentaje de los microorganismos sobreviven en el exterior, al menos inicialmente. Por ese motivo, es posible su presencia en el medio ambiente, ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y en los alimentos, siendo por ello su aislamiento un indicador de contaminación fecal reciente.

Utilizando el sistema de clasificación antigénica propuesto por Kauffman, en la actualidad se reconocen en *E.coli* del orden de 180 antígenos somáticos (O1 a O185) y 56 antígenos flagelares (H1 a H56) (EFSA, 2011) y, aunque las posibles combinaciones O:H son numerosas, tan sólo algunas son frecuentes entre las cepas patógenas (http://www.usc.es/ecoli/E.coli2.html). La determinación de estos antígenos se realiza por técnicas de aglutinación usando antisueros absorbidos para evitar las reacciones cruzadas (Guinée et al., 1981) (Orskov y Orskov, 1984) (Ewing, 1986).

Las cepas patógenas de *E. coli* poseen diferentes tipos de factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad; esto motiva que la virulencia de *E. coli* sea considerada como un fenómeno multifactorial. Entre dichos factores de virulencia cabe destacar la capacidad de producir toxinas, la expresión de adhesinas que facilitan la adherencia a las superficies corporales, la facultad de invadir diferentes tejidos, o la resistencia al suero y a la fagocitosis.

Aunque las cepas de *E. coli* que causan infecciones en seres humanos y animales pueden compartir determinados factores de virulencia, en general, presentan diferentes serotipos y poseen adhesinas específicas que son responsables de su especificidad de huésped. Por lo tanto, las cepas de *E. coli* patógenas para seres humanos no suelen producir infecciones en animales y viceversa. No obstante, se ha comprobado que los animales pueden ser un reservorio de *E. coli* patógenos para las personas. Así, los *E. coli* verotoxigénicos (STEC) que causan colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos, forman parte de la microbiota normal de los rumiantes donde se comportan, en la mayor parte de los casos, como comensales.

En base a los mecanismos de patogénesis y sus factores de virulencia, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis patotipos:

1. *Escherichia coli* enteropatogénicos (EPEC).
2. *Escherichia coli* enterotoxigénicos (ETEC).
3. *Escherichia coli* enteroinvasivos (EIEC).
4. *Escherichia coli* enterohemorrágicos, verotoxigénicos o productores de toxinas Shiga (EHEC/VTEC/STEC).
5. *Escherichia coli* enteroagregativos (EAEC).
6. *Escherichia coli* con adherencia difusa (DAEC).

De todas ellas, la EHEC/VTEC/STEC ha sido la que más se ha relacionado con enfermedades transmitidas por alimentos (Nataro y Kaper 1998) (Lee, 2004) (FSAI, 2005) (EFSA, 2007a, 2007b).

Las cepas STEC que causan infecciones en los seres humanos pertenecen a un amplio número de serotipos O:H (se han descrito más de 400 serotipos) (http://www.usc.es/ecoli/SEROTIPOSHUM.htm). La mayoría de los brotes y casos de SUH han sido atribuidos al serotipo O157:H7, por lo que dada la importancia clínica de este serotipo, es común hablar de dos categorías dentro de los STEC: STEC O157 y STEC no-O157.

En conjunto, los Estados miembros de la Unión Europea (UE) notificaron 16.263 casos de infección humana por STEC durante el periodo 2005-2009. En 2009 se declararon 3.573 casos, lo que supuso un incremento del 13% con respecto al 2008. El ratio de notificación para la UE en 2009 fue de 0,75 por cada 100.000 habitantes. En 2010, se declararon un total de 4.000 casos confirmados de VTEC en humanos por 25 Estados miembros, lo que representa un aumento del 12,0% en comparación con 2009 (3.573). La tasa de notificación de la UE fue de 0,83 por 100.000 habitantes, lo cual es también ligeramente superior a 2009 (0,75 por 100.000 habitantes) (EFSA/ECDC, 2012).

El serogupo O157 ha sido el más frecuentemente declarado en los años 2008 y 2009, representando el 52% de los casos confirmados con serotipos establecidos. Al analizar este dato hay que tener en cuenta el hecho de que muchos laboratorios centran sus técnicas de diagnóstico en la detección de STEC O157 únicamente (ECDC/EFSA, 2011). En 2010, como en años anteriores, el serogrupo VTEC más comúnmente identificado fue O157 (N= 1.501), con una disminución del 18,8% en comparación con 2009 (N= 1.848).

La materia fecal de rumiantes está reconocida como la fuente original de un gran porcentaje de infecciones humanas por STEC. La materia fecal puede contaminar la carne durante el sacrificio en matadero, puede ser arrastrada por corrientes de agua a lagos o fuentes de agua de bebida, o puede depositarse en frutas y verduras por el uso de abonos orgánicos o por uso de agua de riego contaminada con aguas residuales. Algunos animales como insectos, aves, roedores y otros silvestres, pueden transportar esas bacterias desde las heces al agua de bebida y los alimentos. Los seres humanos, por tanto, pueden infectarse a través del contacto directo con una persona infectada o un animal portador, o indirectamente a través del medio ambiente, alimento, agua de bebida o agua superficial que contenga material fecal contaminada con STEC de origen humano o animal (Mora et al., 2011).

Los alimentos que se asocian más frecuentemente con brotes o casos de enfermedades en el hombre por *E. coli* O157:H7 incluyen: frutas y hortalizas consumidas en fresco (lechuga, rábanos, alfalfa, etc.); zumos de naranja y manzana no pasteurizados en los cuales, a pesar de poseer un pH de 3,4 el

microorganismo puede sobrevivir durante varios días; carne parcialmente cocinada como hamburguesas poco hechas; agua contaminada; leche recién ordeñada y productos derivados como mayonesa, yogur y quesos (Riley et al., 1983) (Lee, 2004) (OMS 2005) (EFSA, 2007b) (OMS, 2008).

2. Caracterización del peligro

Las características de virulencia del grupo STEC varía de unas cepas a otras, pero todas por definición producen uno o los dos tipos de verotoxinas VT1/Stx1 y/o VT2/Stx2 que están codificadas en el genoma de profagos. Además, se describen varias variantes en cada una de las ramas Stx en base a sus diferencias fenotípicas, actividad biológica y propiedades de hibridación. Existen diferentes sistemas de nomenclatura para las variantes Stx y sus genes codificadores, pero en el *7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing Escherichia coli infection*, que tuvo lugar en 2009 en Buenos Aires, se acordó un consenso de nomenclatura en el que se establecen dos tipos de Stx (Stx1, Stx2), tres subtipos Stx1 (Stx1a, Stx1c, Stx1d) y siete subtipos Stx2 (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g). La capacidad de los STEC para causar enfermedad en los seres humanos está claramente relacionada con el tipo y subtipo de toxinas. Stx2 es la toxina más potente, siendo los subtipos Stx2a y, en menor medida, Stx2d y Stx2c los comúnmente asociados a SUH (Friedrich et al., 2002) (Feng et al., 2011).

Las cepas STEC pueden presentar factores de virulencia adicionales. El más importante es la intimina, proteína de la membrana externa responsable de la adhesión íntima de las bacterias al epitelio intestinal. La intimina se encuentra codificada en el gen *eae* que forma parte de la isla de patogenicidad cromosómica denominada *Locus for Enterocyte Effacement* (LEE). El gen *eae* está presente en las cepas de algunos de los serotipos más virulentos: O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 y O145:H-. Otro factor de virulencia importante es la enterohemolisina *(ehxA)* codificada en el plásmido EHEC. La presencia del LEE y el plásmido EHEC son marcadores de las cepas clásicas enterohemorrágicas de los principales serotipos implicados en el 80% de los casos de CH y SUH en Europa y Estados Unidos (Garmendia et al., 2005) (Garrido et al., 2006) (EFSA, 2007b) (Mora et al., 2009). De hecho, análisis estadísticos indican que la presencia concomitante de alguna de las toxinas Stx2a, Stx2c, Stx2d, junto con la isla LEE *(eae)* y el plásmido EHEC *(ehxA)* son predictores de signos clínicos graves en pacientes. Además del LEE, se han descrito genes efectores *(nle)* no codificados en el LEE y localizados en islas cromosómicas (OI) asociados significativamente con SUH y CH. Diferentes estudios indican que un sistema de colonización intestinal eficiente es un pre-requisito necesario para causar enfermedad grave en humanos (Beutin y Martin, 2012).

Karmali et al. (2003) propusieron clasificar las cepas STEC en cinco seropatotipos (seropatotipos A a E), atendiendo a su incidencia y asociación con casos de SUH y brotes. El seropatotipo A incluye cepas altamente virulentas de los serotipos O157:H7 (no fermentadoras del sorbitol) y O157:H- (H- no móviles; fermentadoras del sorbitol) causantes de numerosos brotes y frecuentemente asociadas con SUH; Para las cepas de este serotipo las dosis infectivas se sitúan entre 10 y 100 células. El seropatotipo B incluye cepas de serotipos que han causado brotes ocasionales y son relativamente comunes en casos de SUH y CH (O26:H11, O103:H2, O111:H8,H-, O121:H19, O145:H-). El seropatotipo C reúne cepas de serotipos no implicados en brotes pero que se han aislado de pacientes con SUH y CH (O5:H-, O91:H21, O104:H21, O113:H21, O121:H-, O165:H25 y otros). El seropatotipo D incluye cepas de serotipos que

nunca se han asociado con SUH, pero que sí se han aislado de pacientes con diarrea y CH (O7:H4, O69:H11, O103:H25, O113:H4, O117:H7, O119:H25, O132:H-,O146:H21, O171:H2, O172:H-,O174:H8 y otros). Por último, el seropatotipo E incluye muchos serotipos aislados de animales, alimentos y medio ambiente no implicados en casos clínicos en el hombre. Estas razones hacen que sea importante determinar el serotipo de la cepa STEC para poder saber el riesgo patogénico potencial de la misma (Blanco, 2012).

El serotipo de STEC O157:H7 fue identificado por primera vez en 1975, en un paciente de California con diarrea sanguinolenta, y fue asociado a un brote de infección alimentaria (carne picada) en Estados Unidos, en 1982 (Kaspar et al., 2009). Posteriormente, se detectaron casos en Japón (OMS, 2005) (CDC, 2006), Inglaterra (CE, 2002a) y América del Norte por el consumo de zumos (USFDA, 2001) y de espinacas contaminadas (Grant et al., 2008). De acuerdo con los datos publicados, las cepas de STEC no-O157 se describen por primera vez como posible causa de casos esporádicos de SUH en 1975 en Francia, en los que los históricos hospitalarios refieren que cepas STEC del serotipo O103 estaban presentes en algunos pacientes y el primer brote detectado por no-O157, causado por el serotipo O145:HNM, ocurrió en 1984, en el que no se pudo determinar el vehículo de la infección.

En 2009 (EFSA, 2011) el número total de casos de STEC confirmados en la UE y reportados por el TESSy fue de 3.573; aunque esta cifra supuso un incremento del 13,1% sobre los casos confirmados en 2008, el informe de EFSA indica que no se detectó un incremento significativo del número de casos en la UE desde 2005 a 2009. De los casos confirmados en la UE en 2009, el 51,7% de los aislamientos se correspondieron con O157 mientras que en 2010 fue del 41,1%; el segundo serogrupo más frecuentemente detectado fue el O26 (7% de los aislados); y en total se identificaron hasta 18 serogrupos distintos, con un 33,7% de cepas aisladas no tipables. En los datos recogidos en la UE por el ECDC/EFSA (2011) se ha comprobado un notable incremento del número de casos que cursaron con SUH; en el año 2009 el número de casos fue de 242 (un 66% superior a los 146 casos de 2008). En 2010, se declararon un total de 4.000 casos confirmados de VTEC en humanos por 25 Estados miembros, lo que representa un aumento del 12,0% en comparación con 2009 (3.573), (EFSA/ECDC, 2012). En los datos recogidos en la UE por EFSA/ECDC (2012) se ha comprobado que el número de casos que cursaron con SUH en el año 2010 fue de 222, ligeramente inferior al de 2009 (242) pero notablemente superior a los 146 casos de 2008.

El número de casos esporádicos de STEC no-O157 sobrepasa con creces los de brotes, al igual que en el caso de *E. coli* O157:H7. Y comparando los datos de brotes producidos por O157:H7 y no-O157, los STEC no-O157 aparecen mucho menos frecuentemente asociados con carne, agua y vegetales como vehículos de transmisión, y más frecuentemente asociados con contacto persona-persona o con vehículos desconocidos. Estas diferencias son probablemente en parte debidas a que una mejor disponibilidad de métodos analíticos para O157:H7. Además, *E. coli* O157:H7 tiene un comportamiento más patógeno que algunas de las cepas no-O157, con lo que los brotes son reconocidos e investigados en profundidad mucho más rápidamente (Kaspar et al., 2009).

Los grupos vulnerables a STEC O157:H7 lo conforman niños menores de 15 años y personas con más de 70 años (EFSA, 2007a, 2007b). El periodo promedio de incubación del patógeno está comprendido entre uno y ocho días (Lee, 2004) (EFSA, 2007b). Se considera que la dosis mínima infecciosa para STEC O157:H7 es menor de 100 células (Lee, 2004).

En mayo de 2011 tuvo lugar en Alemania un gran brote con 3.842 casos de infección en seres humanos, de los que 855 desarrollaron SUH y 53 fallecieron. Casi simultáneamente se produjo otro brote mucho más pequeño en Francia, cerca de Burdeos (15 casos de diarrea sanguinolenta, de los cuales nueve progresaron a SUH) (Frank et al., 2011). Las características de la cepa implicada en ambos brotes (STEC y EAEC O104:H4), una *E. coli* productora de la toxina Shiga, perteneciente al serotipo O104:H4, y con factores de virulencia comunes con los *E coli* enteroagregativos, ha cambiado la percepción que se tenía de los STEC como patógenos humanos (Beutin y Martin, 2012). Las cepas EAEC del serotipo O104:H4, productoras o no de toxinas Stx, se han aislado sólo ocasionalmente y, por tanto, hasta este momento, éste no era considerado un serotipo importante (ECDC/EFSA, 2011) (Beutin y Martin, 2012). Uno de los datos más sorprendentes del brote por STEC O104:H4 en Alemania y Francia fue la edad de los afectados, en su mayoría adultos, mientras que el grupo de edad de 0 a 9 años se vio menos afectado, en contraste con lo observado en brotes y casos esporádicos por los STEC clásicos. Tampoco se ha podido explicar todavía la elevada prevalencia de mujeres que desarrollaron SUH (68%) tras la infección (Frank et al., 2011).

El hecho de que el número de mujeres afectadas sea mucho mayor de lo normal con respecto a otros brotes por STEC, donde los niños eran los principalmente afectados, se puede relacionar fundamentalmente con los hábitos culinarios, ya que las mujeres consumen mucho más ensaladas con brotes que los niños. Todos estos datos confiman que la cepa hipervirulenta, causante de los brotes de Alemania y Francia, es una cepa atípica en muchos aspectos (Blanco, 2012) tales como:

a) Se trata de una cepa híbrida de dos patotipos ya que es a la vez enteroagregativa y productora de la toxina Shiga del subtipo Stx2a. La combinación de genes de virulencia de estos patotipos no es frecuente y previamente se había observado únicamente en una cepa de otro serotipo (O111:H2) responsable de un pequeño brote en niños con SUH ocurrido en Francia.
b) Pertenece a un serotipo (O104:H4) y una secuencia tipo (ST678) muy raramente observados hasta la fecha en pacientes humanos y nunca observado en cepas aisladas de animales ni de alimentos. Tenemos referencias de este serotipo en cepas STEC aisladas en Alemania (2001), Francia (2004), Corea (2005), República de Georgia (2009), Italia (2009) y Finlandia (2010). Las cepas de Alemania, República de Georgia, Italia y Finlandia sabemos que también eran enteroagregativas y productoras de Stx2a. La cepa de Corea no es enteroagregativa y produce Stx1 y Stx2. Por el momento se desconoce si la cepa de Francia es enteroagregativa. También se han aislado cepas enteroagregativas del serotipo O104:H4, pero no productoras de toxinas Shiga, en la República Centroafricana (1995/1996), Dinamarca (2000) y recientemente en la República de Malí (2009) y España (1996) (datos no publicados).
c) Carece de la isla de patogenicidad cromosómica conocida *Locus Entorocyte Effacement* (LEE) que lleva el gen *eae (attaching and effacing)* que está presente en las cepas STEC más virulentas de los seropatotipos A y B.
d) También se diferencia de la mayoría de las cepas de STEC, en que es multirresistente, siendo productora de la beta-lactamasa de espectro extendido CTX-M-15 también presente en el clon intercontinental de *E. coli* O25b:H4-ST131.
e) Además de genes de virulencia de STEC y EAEC, la cepa posee algunos factores de virulencia de *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC).

Es evidente que no sorprende el grado de virulencia del STEC O104:H4 si tenemos en cuenta el gran arsenal de genes de virulencia que tiene la cepa responsable de los brotes de Alemania y Francia. Pero se desconoce el porqué la cepa O104:H4 es tan virulenta. Se ha especulado con que su capacidad enteroagregativa le permita colonizar mejor el epitelio intestinal y con que tenga mecanismos que le permitan producir ó liberar más cantidad de toxina Stx2a. Tiene por lo menos tres adhesinas (AAF/I, LPF-lpfAO26 e Iha), dos sideróforos (aerobactina y yersiniabactina) y tres tipos de proteasas SPATE (Pic, Sig A y SepA). La combinación de estos tres tipos de proteasas se da en un muy pocas cepas (Blanco, 2012).

Se cree que es una cepa nueva probablemente de origen humano que ha emergido recientemente a partir de una cepa enteroagregativa (EAEC) del serotipo O104:H4 que ha adquirido un fago portador del gen *stx2a* a partir de una cepa STEC. A partir de otra cepa adquiriría el plásmido que codifica para el enzima CTX-M-15. Esto se ha deducido después de comparar el genoma completo de varios aislados de la cepa del brote alemán con el genoma de cepas enteroagregativas del serotipo O104:H4 y de otros serotipos, y con el genoma de cepas de otros patotipos de *E. coli* diarreagénicos (ETEC, EPEC, EIEC) (Blanco, 2012).

Las cepas de EAEC causan diarreas de larga duración principalmente en niños y viajeros de países del tercer mundo, pero también son una causa significativa de diarrea en Europa, incluida España (Blanco et al., 2006). Su reservorio son únicamente los seres humanos. Presentan un plásmido (pAA) que codifica para una adhesina fimbrial que es responsable del patrón de adherencia enteroagregativa a células HEp-II y al epitelio intestinal. La cepa responsable de los brotes de Alemania y Francia posee la fimbria AAF/I, mientras que la cepa enteroagregativa y productora de Stx2a aislada en Alemania en el año 2001 poseía la fimbria AAF/III y era sensible a los antibióticos (Bielaszewska et al., 2011).

En este contexto es importante considerar cual es la situación en España respecto a estos microorganismos, a través de estudios llevados a cabo en algunas regiones donde el ganado vacuno es una actividad económica importante. En España, entre 1992 y 2011, se procesaron un total de 14.653 coprocultivos para la presencia de STEC O157:H7 y no-O157. Las cepas STEC se detectaron en 415 (2,8%) de los coprocultivos examinados. En total se detectaron 65 (0,4%) casos de infección por el STEC O157:H7 y 271 (1,8%) casos de infección por no-O157 (Tabla 1). El serotipo O26:H11 fue el más frecuente observado dentro de los no-O157 (Tabla 2). Ninguna de las cepas verotoxigénicas aislada en Galicia de pacientes humanos entre los años 1992 y 2011 perteneció al serotipo O104:H4 implicado en los brotes de Alemania y Francia. Los STEC son el tercer enteropatógeno más frecuentemente identificado en los coprocultivos realizados en el hospital de Lugo después de *Salmonella* y *Campylobacter*, provocando un nivel significativo de infecciones en este área sanitaria. A partir de los datos de Lugo, se puede extrapolar que los STEC O157:H7 producen más de 500 casos de infecciones en seres humanos y que los no-O157 más de 2.000 cada año en España (Blanco et al., 2004a) (Mora et al., 2011).

Tabla 1. Prevalencia de ECVT en coprocultivos de pacientes del Hospital Lucus Augusti

Nº de coprocultivos de niños y adultos con diarrea							
Año	Total coprocultivos analizados	STEC					
		O157:H7 aislados		No-O157 aislados		Total detectados	
1992-1999	5.054	24	0,5%	87	1,7%	126	2,5%
2003-2005	3.970	12	0,3%	75	1,9%	144	3,6%
2006-2010	4.692	27	0,6%	85	1,8%	119	2,5%
2011	937	2	0,2%	24	2,6%	26	2,8%
Total	14.653	65	0,4%	271	1,8%	415	2,8%

Fuente: (Mora et al., 2011) y datos actualizados no publicados.

Tabla 2. Serotipos más frecuentes en cepas STEC humanas en España

Serotipo	Grupo filogenético	Secuencia tipo	Seropatotipo	Intimina
O5:H-	A	ST342	C	ß1
O26:H11	B1	ST21	B	ß1
O103:H2	B1	ST17	B	ϵ1
O111:H8	B1	ST16	B	θ
O113:H21	B1	ST56	C	-
O118:H16	B1	ST21	-	ß1
O145:H-	D	ST32	B	γ1
O146:H21	B1	ST442	D	-
O157:H7	D	ST11	A	γ1

Fuente: (Mora et al., 2011).

3. Evaluación de la exposición

Rutas de contaminación de los alimentos

Las cepas STEC toleran temperaturas mínimas de 7 a 10 °C y máxima, de 50 °C, siendo 37 °C la temperatura óptima de crecimiento. Además, son el grupo más ácido-resistente a diferencia de las otras cepas de *E. coli*, ya que sobreviven a un pH menor a 4,4, y son capaces de crecer en alimentos con actividad de agua de 0,95 (Lee, 2004) (EFSA, 2007b) (OMS, 2008). En lo que respecta a las condiciones de crecimiento determinadas para *E. coli* O157:H7, éstas abarcan temperaturas mínimas de 2,5 a 6,5 °C y máximas de 44-45 °C, pH de 4 a 9; y, tolera concentraciones de sal hasta un 8% (FSAI, 2005) (OMS, 2008).

El ganado bovino es la fuente más importante de infecciones humanas (carne de vacuno, productos lácteos, contaminación fecal bovina, etc.). Los datos sobre la prevalencia de STEC O157 y STEC no-O157 son muy variables entre países, tanto en el ganado lechero (0,4-74%) como en el ganado destinado a consumo de carne (2,1 a 70,1%). La Tabla 3 muestra la prevalencia de STEC en ganado de abasto (EFSA/ECDC, 2011, 2012). El ganado suele ser portador de varios serotipos, algunos de los cuales no parecen ser de alto riesgo para el hombre porque no expresen alguno de los factores de

virulencia más importantes. Los STEC no se consideran patógenos para los rumiantes, salvo cuando las infecciones se producen en los animales jóvenes antes del destete (relacionado con diarrea neonatal) (Gyles, 2007) (ECDC/EFSA, 2011) (Mora et al., 2011). Un estudio realizado en Alemania encontró una asociación positiva entre las infecciones causadas por diferentes serotipos de STEC y la densidad de ganado en un área. A partir de datos de más de 3.000 casos de STEC, los análisis indicaron que el riesgo de infección aumentó en un 68% por cada 100 cabezas adicionales por km^2 (Friesema et al., 2010).

Tabla 3. Datos de prevalencia de STEC en carnes y ganado bovino y vacuno en la UE (2007-2010)

		2007			2008			2009			2010		
Animal/ categoría de alimen.	**Nº de Estados miembros***	**N**	**STEC**	**STEC O157**	**N**	**STEC**	**STEC O157**	**N**	**STEC**	**STEC O157**	**N**	**STEC**	**STEC O157**
Carne de vaca	12-14	14.115	0,3%	0,1%	14.598	0,3%	0,1%	9.285	2,3%	0,7%	8.566	0,5%	0,1%
Carne de oveja	3-5	285	1,8%	0%	1.263	0,7%	0%	248	3,2%	0%	394	7,4%	0%
Vacuno (animales)	9-12	5.154	3,6%	2,9%	5.368	2,2%	0,5%	5.555	6,8%	2,7%	6.800	13,5%	0,2%
Ovejas (animales)	4-8	533	0,9%	0,4%	671	3,1%	1,6%	324	20%	0,3%	773	30%	0%

*Los valores totales corresponden a los datos suministrados por el número correspondiente de Estados miembros de la Unión Europea. **Fuente:** (EFSA/ECDC, 2011, 2012).

Un estudio llevado a cabo en la ciudad de Lugo se ha observado en los últimos años un descenso importante en la prevalencia de STEC en carne picada de vacuno puesta a la venta. Entre las 1.539 muestras analizadas entre los años 1995-2012, se detectó STEC O157:H7 en nueve casos (0,6%) y no-O157 en 150 (9,7%). Especialmente importante desde el punto de vista de salud pública es el hecho de no haber detectado ninguna muestra positiva para el serotipo O157:H7 altamente virulentos en el período 2005-2009. Ninguna de las cepas verotoxigénicas aisladas en Lugo perteneció al serotipo O104:H4 implicado en los brotes de Alemania y Francia (Tabla 4).

Tabla 4. Prevalencia de cepas STEC O157:H7 y de otros serotipos en carne picada de vacuno en Lugo

Año	Muestras	STEC O157:H7		STEC no-O157		Total	
1995	58	3	5,0%	8	14%	10	17%
1996	91	0	0,0%	8	9%	8	9%
1997	173	1	0,6%	20	12%	21	12%
1998	133	1	0,8%	18	14%	18	14%
2001	80	1	1,3%	6	8%	7	9%
2002	20	0	0,0%	1	5%	1	5%
2003	230	2	0,9%	29	13%	30	13%
2005	250	0	0,0%	29	12%	29	12%
2006-2007	160	0	0,0%	14	9%	14	9%
2008	170	0	0,0%	11	6%	11	6%
2009	100	0	0,0%	4	4%	4	4%
2011	40	1	2,5%	0	0%	1	3%
2012	34	0	0,0%	2	6%	2	6%
Total	**1.539**	**9**	**0,6%**	**150**	**9,7%**	**156**	**10,1%**

Fuente: (Mora et al., 2007) (Mora et al., 2011).

La Tabla 5 muestra datos de prevalencia de STEC en carne envasada en atmósfera modificada en un nuevo estudio realizado entre 2009 y 2011. En una de las muestras se detectó una cepa del serotipo O104:H7 con el gen *stx2*. Este tipo de cepa habría dado positiva en los ensayos comerciales de PCR en tiempo real diseñados para detectar la cepa STEC O104:H4 causante de los brotes de Alemania y Francia, ya que se basan en la detección de los genes que codifican para el antígeno O104 y la toxina Stx2, y habría saltado la alarma, a pesar que la cepa presente en la carne era del seropatotipo D y por lo tanto de baja virulencia. Lo que confirma la importancia del serotipado y caracterización con respecto a sus genes de virulencia, perfil de PFGE permitiendo una comparación con las causantes de infecciones en seres humanos para establecer su grado de virulencia.

Tabla 5. Detección de STEC en carne de vacuno, porcino y pollo en Lugo

*Vacuno (n=140/octubre 2011-abril 2012)				
Vacuno-carne picada fresca				
			STEC	
NMP	Totales	%	O157:H7	no-O157
<10	59	79,7%	1	0
10-99	10	13,5%	0	1
100-999	3	4,1%	0	0
>999	2	2,7%	0	1
Total	**74**	**-**	**1 (1,4%)**	**2 (2,7%)**
Vacuno-carne envasada atm. protectora				
			STEC	
NMP	Totales	%	O157:H7	no-O157
<10	45	68,2%	0	4
10-99	16	24,2%	1	3
100-999	4	6,1%	1	4
>999	1	1,5%	0	1
Total	**66**	**-**	**2 (3,0%)**	**12 (18,2%)**

*Porcino (n=170/enero 2011-mayo 2012)				
Porcino-carne picada fresca				
			STEC	
NMP	Totales	%	O157	no-O157
<10	92	68,7%	0	3
10-99	24	17,9%	0	2
100-999	14	10,4%	0	3
>999	4	3,0%	1	3
Total	**134**	**-**	**1 (0,7%)**	**11 (8,2%)**
Porcino-carne envasada atm. protectora				
			STEC	
NMP	Totales	%	O157	no-O157
<10	33	91,7%	0	1
10-99	3	8,3%	0	1
100-999	0	0,0%	0	0
>999	0	0,0%	0	0
Total	**36**	**-**	**0 (0,0%)**	**2 (5,6%)**

*Pollo (n=200/septiembre 2009-diciembre 2010)				
Pollo-carne fresca				
			STEC	
NMP	Totales	%	O157	no-O157
<10	84	49,4%	0	1
10-99	66	38,8%	0	1
100-999	20	11,8%	0	0
>999	0	0,0%	0	0
Total	**170**	**-**	**0 (0,0%)**	**2 (1,2%)**
Pollo-carne envasada atm. protectora				
			STEC	
NMP	Totales	%	O157	no-O157
<10	5	16,7%	0	0
10-99	18	60,0%	0	0
100-999	6	20,0%	0	0
>999	1	3,3%	0	1
Total	**30**	**-**	**0 (0,0%)**	**0 (0,0%)**

***Fuente:** Laboratorio de Referencia de *E. coli* en Lugo.

Son varios los estudios realizados en España acerca del papel del ganado vacuno como reservorio de STEC. Así cuando en Galicia (1993-1995) se pudo comprobar que una tercera parte de los terneros y vacas eran portadores, estando presentes las cepas STEC altamente virulentas del serotipo O157:H7 en el 12% de los terneros y en el 22% de las granjas muestreadas. En 1998, un estudio realizado en Navarra detectó la presencia de STEC O157:H7 en varios mataderos y cebaderos de vacuno en proporciones que oscilaron entre el 10 y el 19% para los mataderos y el 0 y 23% para cebaderos. Los datos obtenidos en España están de acuerdo con los encontrados en otros países, y confirman que en torno al 10% de las cabezas de ganado bovino están colonizadas por cepas STEC O157:H7 (Blanco et al., 2004b).

Tras determinarse los serotipos y los genes de virulencia de 514 cepas de STEC bovinas aisladas en España, se comprobó que pertenecían a 66 serogrupos y 113 serotipos; sin embargo el 52% de las cepas pertenecían a únicamente 10 serotipos (O4:H4, O20:H19, O22:H8, O26:H11, O77:H41, O105:H18, O113:H21, O157:H7, O171:H2 y ONT:H19). Muchas de las cepas bovinas pertenecían a seropatotipos previamente encontrados entre los STEC causantes de infecciones en seres humanos. Ninguna de las cepas bovinas aisladas en España de STEC perteneció al serotipo O104:H4. No obstante, se detectaron dos cepas O104:H21 *vt1 vt2* de la secuencia tipo ST672 (Blanco et al., 2004b) (Mora et al., 2011).

Blanco et al. (2003) llevaron a cabo un estudio en colaboración con la Facultad de Veterinaria de Cáceres en el año 1997. Tras estudiar 1.300 muestras procedentes de 93 explotaciones de Extremadura, se encontró que el 0,4% de los corderos estaban colonizados por ECVT O157:H7 y el 36% por STEC no-O157. Tras serotipar 384 cepas ovinas, se observaron 35 serogrupos y 64 serotipos, sin embargo, el 72% de las cepas pertenecía a alguno de los siguientes 12 serotipos: O5:HNM, O6:H10, O91:HNM, O117:HNM, O128:HNM, O136:H20, O146:H8, O146:H21, O156:HNM, O166:H28 y ONT:H21. Los seropatotipos de los STEC ovinos resultaron ser diferentes a los STEC de origen bovino, sin embargo muchos de ellos también se han encontrado en cepas verotoxigénicas de origen humano. Ninguna de las cepas ovinas de ECVT perteneció al serotipo O104:H4. No obstante, detectamos 10 cepas O104:H7 *vt1* (la mayoría de la secuencia tipo ST1817).

En un estudio llevado a cabo en colaboración con las Facultades de Veterinaria de Madrid y Murcia en el año 2003 (Cortés et al., 2005) (Orden et al., 2008). Se procesaron 222 muestras fecales de cabritos y cabras de 12 granjas de Murcia, encontramos que el 0% de los animales estaban colonizados por cepas STEC O157:H7 y el 48% por no-O157. Tras serotipar 106 cepas caprinas, se observaron 25 serotipos, siendo los más frecuentes los serotipos: O5:HNM, O76:H19, O126:H8, O146:H21, ONT:HNM y ONT:H21. Ninguna de las cepas caprinas de ECVT perteneció al serotipo O104:H4. Tampoco ninguna de las 106 cepas presentó el gen *eae*. No obstante, el 16% de las cepas de ECVT caprinas pertenecieron a serotipos implicados en el SUH.

Es importante destacar que el gen *eae* no se detectó en ninguna de las cepas STEC caprinas y únicamente estaba presente en el 6% de las cepas ovinas, frente al 29% de las bovinas y el 56% de las causantes de infecciones en seres humanos. Teniendo en cuenta que el gen *eae* se asocia normalmente con las cepas de mayor potencial de virulencia está claro que los grandes rumiantes representan un reservorio más problemático por lo que merece una especial atención en lo que respecta a medidas de prevención.

Aunque los rumiantes de abasto, especialmente el ganado vacuno, son el principal reservorio de cepas STEC, la fauna silvestre, incluidos los animales de caza, juegan también un importante papel

como reservorio de estos patógenos. En un estudio reciente del LREC-USC, Mora et al. (2012) aislaron cepas STEC no-O157 del 53% de los corzos muestreados y STEC O157 del 0,56%, en concordancia con lo descrito por otros autores, en éste, y otros rumiantes silvestres (Sánchez et al., 2009) (Sánchez et al., 2010). En el estudio de Mora et al. (2012) se aislaron además cepas STEC de jabalíes (8,4%) y zorros (1,9%); y se demostró que cepas STEC aisladas de esos animales silvestres (corzo, jabalí, zorro) de los serotipos O5:H-, O26:H11, O76:H19, O145:H28, O146:H21 y O157:H7 presentaban una similitud superior al 85% cuando se compararon sus perfiles de macrorrestricción con los de cepas STEC de las mismas características aisladas de pacientes humanos. En este estudio se demostró, por tanto, que determinados animales silvestres juegan un papel epidemiológico importante en el mantenimiento y transmisión de cepas STEC potencialmente patógenas para el ser humano. No obstante, únicamente 14 (10%) de las 135 cepas STEC presentaron el gen *eae*: 7 de corzos, 4 de jabalíes y 3 de zorros. Se han realizado también estudios que señalan la carne de caza como fuente potencial de transmisión de STEC al ser humano (Miko et al., 2009) (Martin y Beutin, 2011).

Una fuente importante de infección para el ganado son los piensos y agua contaminados con heces de animales infectados. Los estudios realizados indican que STEC O26 pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el estiércol: hasta tres meses en las fosas de estiércol y el estiércol líquido, y un año en los campos fertilizados con estiércol, dependiendo de la temperatura y el tipo de suelo. La persistencia de estos patógenos en ambientes contaminados con estiércol presenta implicaciones importantes para la salud debido a su transmisión, no solo en la producción agrícola, sino también en otros ámbitos, como las ferias de ganado y granjas escuela, en las que los niños están expuestos a la presencia de estos microorganismos (Gyles, 2007) (Kaspar et al., 2009) (ECDC/EFSA, 2011) (Mora et al., 2011).

El material fecal puede contaminar la carne durante el faenado en el matadero, en el desollado de los animales, o por una deficiente evisceración; se puede dispersar en corrientes de agua, ríos o fuentes de agua potable; o se puede depositar en frutas y verduras cuando el estiércol se utiliza para fertilización, o a través de aguas residuales contaminadas utilizadas para el riego. Las personas, pueden infectarse tanto directamente, a través del contacto con una persona infectada o un portador animal, como indirectamente a través del medio ambiente, alimentos, agua potable contaminada o agua de consumo no potable, o la superficie de agua contaminada con materia fecal que contenga STEC de origen humano o animal (Kaspar et al., 2009) (Mora et al., 2011).

En 2010, EFSA señala que en un total de 8.566 muestras de carne de vacuno analizada en un total de 12 Estados miembros, se aisló STEC en un 0,5% de las muestras, siendo el serotipo O157:H7 aislado en el 0,1% de las muestras analizadas. Los porcentajes de aislamiento oscilaron entre el 0 y 1,6% en muestras de mataderos, entre el 0 y el 3,9% en plantas de procesado y entre el 0 y el 5,1% (España) en muestras en establecimientos de venta (EFSA/ECDC, 2012).

Las frutas y hortalizas crudas son un componente importante de la dieta humana y el consumidor está muy concienciado del beneficio que supone para la salud su consumo. Sin embargo, en la literatura científica se pueden encontrar cada vez más trabajos que describen brotes de infección de STEC asociados con las frutas y hortalizas particularmente con los brotes de semillas (Michino et al., 1999) (Breuer et al., 2001) (Mohle-Boetani et al., 2001) (Ferguson et al., 2005) y ensaladas de vegetales

crudos (Ackers et al., 1998) (Hilborn et al., 1999) (Söderström et al., 2005) (CDC, 2006) (Friesema et al., 2008) (Wendel et al., 2009). En la Tabla 6 se puede apreciar la prevalencia de STEC/VTEC en muestras de vegetales (Mora et al., 2011). El *Standing Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health* (SCVPH) emitió un informe sobre *E. coli* verotoxigenica e identificó, entre otros, a los vegetales frescos, en particular los brotes de semillas, zumos de fruta y bebidas de hortalizas sin pasteurizar como una fuente de preocupación en salud pública (SCVPH, 2003). Estas categorías de alimentos también se han considerado como una ruta importante de transmisión procedente de los alimentos en un informe de EFSA sobre STEC (EFSA, 2007b).

El vehículo más frecuente en los brotes causados por STEC es la carne de vacuno poco cocinada, pero en los últimos años cada vez son más los brotes causados por productos vegetales, especialmente de ensaladas y brotes de diferentes semillas. Curiosamente el brote más grande en número de casos de diarrea y CH fue producido por un STEC O157:H7 en el año 1996 en la ciudad de Sakai (Osaka, Japón) y se asoció con el consumo de brotes de rábano. Las cepas EAEC también han causado varios brotes asociados con el consume de brotes, incluyendo un brote por el serotipo ONT:H10 sucedido en el Japón en 1993 que afectó a más de 2.000 personas. Las investigaciones epidemiológicas apoyan la hipótesis de que los brotes de Alemania y Francia están relacionados, ya que han sido causados por la misma cepa enteroagregativa STEC O104:H4 y por el mismo alimento: brotes obtenidos a partir de semillas de fenogreco importadas de Egipto. En estudios futuros se deberá examinar si las cepas enteroagregativas tienen mecanismos especiales que le permitan adherirse a la superficie de los vegetales. Lo que es evidente que las condiciones de producción de los brotes (humedad y temperatura), favorecen el crecimiento de los microorganismos contaminantes. Se desconoce cómo han podido contaminarse las semillas, pero se supone que puede haberse debido al empleo de agua de riego contaminada con aguas residuales de origen humano (Mora et al., 2011) (Blanco et al., 2012).

Tabla 6. Prevalencia de cepas STEC/VTEC en vegetales frescos y en cuarta gama

Producto	Nº	<10	%	10-99	%	>99	%	ECVT	%	O157:H7	O104:H4
Pepinos	32	32	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0
Tomates	36	36	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0
Lechugas	54	50	93%	4	7%	0	0%	1	1,9%	0	0
Brotes de soja	6	6	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0
Endivias	2	2	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0
Brecol	7	7	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0
Puerro	2	2	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0
Pimientos	6	6	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0
Zanahoria	1	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0
Cebolleta	1	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0
Bolsa-ensaladas	53	52	98%	1	2%	0	0%	0	0%	0	0
Total muestras	**200**	**195**	**98%**	**5**	**2,5%**	**0**	**0%**	**1**	**0,5%**	**0**	**0**

Fuente: (Mora et al., 2011).

La contaminación de verduras y hortalizas puede ocurrir a nivel superficial o en los tejidos internos. Aunque la contaminación de STEC intratisular se ha visto fundamentalmente en las hojas de las verduras también se han descrito casos de internalización de *E. coli* O157 en tomates (Ibarra-Sánchez et al., 2004). La presencia de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica viable se ha encontrado en tejidos internos de brotes de rábano y estomas procedentes de semillas experimentalmente contaminadas con la bacteria (Itoh et al., 1998).

La contaminación de frutas y hortalizas puede acontecer en los diferentes eslabones de la cadena alimentaria (Beuchat y Ryu, 1997) (FAO/OMS, 2008):

1. Durante la producción primaria incluida la recolección.
2. Durante la post-recolección incluido el manejo, transporte y procesado.
3. En la comercialización en tiendas y supermercados.
4. En los establecimientos de elaboración de comidas preparadas y después de la venta durante el transporte y en el ambiente doméstico por una mala manipulación por parte del consumidor.

Las posibles rutas de la contaminación son: el agua de irrigación contaminada con residuos procedentes de granjas de animales así como de aguas del alcantarillado, la aplicación de fertilizantes orgánicos de origen animal o humano y el contacto directo de animales (salvajes o domésticos) con el producto vegetal fresco cuando esta creciendo en el campo. La irrigación por inundación también puede ser una ruta de contaminación potencial si las granjas ganaderas están cerca de los campos de producción de hortalizas. En el proceso de comercialización y preparación culinaria, las rutas de contaminación se relacionan con el uso de agua de lavado contaminada, útiles no desinfectados y deficientes prácticas de manejo higiénico de frutas y hortalizas (Söderström et al., 2005) (Tyrrel et al., 2006) (Gelting et al., 2011).

Estrategias de control

Las investigaciones sobre la prevención de la contaminación de los alimentos y el agua por STEC y las estrategias para eliminar o limitar radicalmente el crecimiento de cualquier STEC que pueda estar presentes en los alimentos se han concentrado principalmente en *E. coli* O157:H7. No obstante también se han llevado a cabo estudios para las cepas STEC que no son O157-. La susceptibilidad de los STEC OH157:H7 y no-O157 a diversas técnicas de intervención es probablemente similar a la de otras *E. coli*, aunque hay diferencias entre las cepas en cuanto a su tolerancia al ácido y sensibilidad a otros agentes como la temperatura (Kaspar et al., 2009).

Actualmente se encuentran en desarrollo varios tipos de intervenciones para aplicarlas antes del sacrificio de los animales, mientras que ya se han validado e incorporado numerosas intervenciones post-sacrificio dirigidas a *E. coli* O157:H7 con objeto de descontaminar la canal después de la carnización de los animales.

La granja y el tipo de alimentación de los animales parecen estar en el origen de la contaminación de las carnes en los mataderos. Las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y de Producción (BPM) son las primeras medidas a tener en cuenta en el control de STEC y otros microorganismos patógenos tanto en alimentos de origen animal como vegetal. La aplicación del APPCC es una herramienta útil para prevenir la contaminación por dichos microorganismos lo que puede contribuir a su disminución a nivel

de granja o campo de cultivo. No obstante, en la aplicación del APPCC para la producción primaria es bastante difícil objetivar algunos puntos de control crítico. Por otro lado, se ha estudiado el efecto del tipo de alimentación en la excreción de *E. coli* por parte del ganado, en un intento de disminuir la presencia de este microorganismo antes de que los animales vayan al matadero. Algunos estudios indican que el ganado alimentado con dietas basadas en cebada (Berg et al., 2004) o con los granos mojados de los destiladores (Wells et al., 2009) aumentan la excreción fecal de *E. coli* O157:H7 en comparación con la alimentación normal basada en dietas con maíz.

Se está desarrollando también una investigación importante sobre la alimentación del ganado con probióticos para excluir los patógenos por el mecanismo de exclusión competitiva. Con algunos organismos se han obtenido resultados prometedores a la hora de reducir la incidencia de *E. coli* O157:H7 en los terneros (Zhao et al., 1998).

Los bebederos de agua también parecen ser otra fuente de contaminación. Se ha comprobado que la cloración del agua parece ser el tratamiento más adecuado para controlar los patógenos que puedan estar presentes en el agua de los bebederos. No obstante, la presencia de abundante materia orgánica en el agua puede dar lugar a que disminuya la cantidad de cloro residual lo que limita la eficacia de la cloración. La higienización del agua de beber usando ácido láctico y sulfato de calcio en combinación con benzoato, ácido caprílico, ácido butírico o dióxido de cloro han demostrado conseguir más de tres reducciones logarítmicas en *E. coli* O157:H7, O26:H11 y O111:NM (Zhao et al., 2006).

Se están evaluando las intervenciones que implican el uso de agentes como las vacunas y bacteriófagos durante las etapas previas al sacrificio en el matadero aunque aún es pronto para tener resultados que certifiquen su utilidad en el control de STEC (Loneragan y Brashears, 2005) (LeJeune y Wetzel, 2007) (Johnson et al., 2008).

Las canales de los animales sacrificados son difíciles de descontaminar debido a su forma y estructura. Muchos tratamientos requieren un contacto físico con la superficie de la misma. Aunque la descontaminación de las canales no está permitida mediante el uso de antimicrobianos y otros tratamientos y ni tan siquiera el uso de ácido láctico en canales de vacuno está autorizado a nivel comunitario, se ha comprobado que el uso de vapor a presión o el lavado con agua caliente o con ácido láctico de las superficies de las canales, reduce de forma efectiva la contaminación con *E. coli* O157:H7 (Koohmaraie et al., 2005) (Bosilevac et al., 2006). Estas técnicas de intervención para eliminar *E. coli* O157:H7 a partir de la superficie de las canales también han demostrado su eficacia contra O26:H11 y O111:H8 (Cutter y Rivera-Betancourt, 2000). No obstante es preciso indicar que hasta la fecha existe un reglamento, el Reglamento (CE) Nº 853/2004 (UE, 2004), que establece normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal dirigidas a los operadores de empresas alimentarias. Dispone que estos no podrán emplear ninguna sustancia distinta del agua para eliminar la contaminación de superficie de los productos de origen animal, a menos que el uso de dicha sustancia haya sido autorizado con arreglo a dicho Reglamento. EFSA (2011c) adoptó un dictamen científico sobre la evaluación de la seguridad y la eficacia del ácido láctico para la eliminación de la contaminación microbiana de la superficie de las canales de vacuno y piezas de carne. En su dictamen, EFSA concluye que los tratamientos con ácido láctico para la descontaminación de la superficie de canales de la especie bovina y piezas de carne no debe preocupar bajo el punto de vista de la seguridad alimentaria, a condición de que la

sustancia utilizada cumple con las especificaciones de la Unión para los aditivos alimentarios. Además, EFSA concluye que los tratamientos con ácido láctico proporcionan una reducción significativa de la contaminación microbiológica en comparación con la ausencia de tratamiento o al tratamiento con agua potable y que es poco probable que tales tratamientos puedan contribuir al desarrollo de resistencias microbianas.

Recientemente, Aymerich et al. (2008) han revisado los efectos de las tecnologías de procesado sobre la supervivencia de *E. coli* y otras bacterias presentes en carne o productos cárnicos. Entre los procedimientos discutidos se encontraba la irradiación, altas presiones hidrostáticas, antimicrobianos naturales, envases activos y tratamientos térmicos. En estos estudios no se han llevado a cabo comparaciones entre *E. coli* O157:H7 y STEC no-O157, pero sí se describen cuales son las condiciones de eficacia general frente a *E. coli.* Hay que decir que la decisión del Consejo Europeo de 18 de diciembre de 2008 indica lo siguiente respecto al uso de antimicrobianos: se rechaza la propuesta de la Comisión de un Reglamento del Consejo que desarrolla el Reglamento (CE) Nº 853/2004 en lo relativo a la utilización de sustancias antimicrobianas para eliminar la contaminación microbiana de las canales de aves de corral. También se ha investigado la combinación de varias tecnologías de conservación no térmica y térmica bajo el concepto de tecnologías de barrera con el fin de aumentar su eficiencia. Las tecnologías térmicas de calentamiento rápido, tales como microondas y radiofrecuencia o túneles de pasteurización por vapor ofrecen nuevas posibilidades para la pasteurización de los productos cárnicos, especialmente en los alimentos listos para su consumo que contienen carne. La aplicación de algunas de estas tecnologías después del envasado final puede evitar la contaminación cruzada durante la manipulación de post-procesamiento (Aymerich et al., 2008).

Las altas presiones hidrostáticas y la luz ultravioleta parecen ser las tecnologías más promisorias porque tienen pocos inconvenientes para su aprobación por la autoridades sanitarias, no necesitan un etiquetado especial ya que no llevan aditivos químicos y si se usan adecuadamente no se producen cambios en las textura o sabor y aroma del producto (Hayakawa et al., 1994) (Alpas et al., 1999) (Chun et al., 2010). En algunos estudios recientes se ha examinado la inactivación de STEC mediante irradiación ionizante (Beuchat et al., 1998) (EFSA 2011b). Los autores concluyeron que una dosis de 1,8 kGy proporcionaría cinco reducciones logarítmicas.

La OMS (2008) ha revisado minuciosamente, en un informe, los riesgos microbiológicos que tienen lugar en frutas, hortalizas, especias y hierbas medicinales, incluyendo en dicho informe guías sobre las opciones de mitigación. También la Comisión del *Codex Alimentarius* publicó un Código de Prácticas de Higiene para las frutas y hortalizas frescas (CAC, 2003).

El uso de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Manipulación (BPM) y Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) en el cultivo e industrialización de fruta fresca y hortalizas constituyen el marco básico en la producción de alimentos inocuos para el consumidor (EFSA/ECDC, 2011). Las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) describen las medidas preventivas aplicadas en las operaciones agrícolas para reducir la contaminación del producto y proporcionar orientación acerca de las operaciones para incrementar la inocuidad alimentaria comenzando en el campo. La incorporación de las Buenas Prácticas Agrícolas proporciona un nivel importante de seguridad al vendedor al por menor de que el producto es tan inocuo como sea razonablemente posible.

En general se recomienda la aplicación de estrategias de mitigación descritas en las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en línea con las recomendaciones de las organizaciones internacionales (CAC, 2003) (OMS, 2008). En consecuencia, en la etapa de cultivo puede ser de particular Interés aplicar las siguientes medidas:

- Evitar el acceso de animales de granja (rumiantes en particular) en el entorno inmediato de los campos de cultivo.
- El uso de agua para riego y para la agricultura en general de una calidad microbiológica adecuada.
- El control de la contratación, manejo y tratamiento de estiércol y purines que se van a utilizar para fertilizar los campos destinados al cultivo de frutas y hortalizas para al consumo humano.

Tras algunas investigaciones de los brotes de origen alimentario asociados con las verduras de hoja y especias y hierbas medicinales se ha llegado a la conclusión de que las malas prácticas de higiene durante la manipulación son una fuente de contaminación importante (OMS, 2008). Es esencial la formación y sensibilización sobre las prácticas de higiene en toda la cadena alimentaria. Además, y puesto que hay pruebas de portadores asintomáticos de STEC en humanos, la detección de las personas portadoras involucradas en el manejo de los alimentos es de la mayor importancia (Stephan et al., 2000) (Silvestro et al., 2004). En consecuencia, el seguimiento y la exclusión de los portadores de STEC involucrados en la manipulación de alimentos se deben considerar como una opción de mitigación o de control.

Según la OMS (2008), las tecnologías actuales o prácticas aplicadas durante el procesado post-cosecha no eliminan eficazmente los microorganismos que contaminan a las frutas y hortalizas. Por tanto, los esfuerzos se deben dirigir fundamentalmente a la prevención de la contaminación tanto en pre-cosecha como en post-cosecha.

A pesar de que se pueden utilizar varios desinfectantes para reducir la carga microbiana en frutas y hortalizas, su eficacia es variable y no son capaces de garantizar la eliminación total de los patógenos (OMS, 1998). En general, los tejidos internos de las frutas y hortalizas se consideran estériles. Sin embargo, las bacterias pueden estar presentes en pequeñas cantidades como resultado de la absorción de agua de riego o como consecuencia de ciertos procedimientos de lavado y si estas aguas están contaminadas con patógenos como STEC también pueden internalizarse (CE, 2002b). La adhesión de los patógenos a las superficies y al interior de los tejidos, limita la utilidad de los procesos convencionales y métodos químicos desinfectantes para prevenir la transmisión de contaminación en frutas y hortalizas frescas. La conclusión es que el único método eficaz de eliminación de STEC de los alimentos es la introducción de tratamientos bactericidas, tales como el tratamiento térmico (por ejemplo, cocción o pasteurización) o irradiación (EFSA 2011b). Por otro lado, conviene considerar que el lavado puede ayudar a la propagación de la contaminación y la internalización de las bacterias (OMS, 1998), por tanto es necesario buscar posibles alternativas a la desinfección química.

Las operaciones de corte o picado eliminan las barreras protectoras naturales de la planta intacta y por lo tanto puede aumentar el riesgo de presencia de STEC debido a creación de condiciones más favorables para su supervivencia y crecimiento. Por lo tanto, la aplicación de los programas APPCC en la elaboración y envasado es un requisito imprescindible para disminuir el riesgo de STEC en frutas y

hortalizas (James, 2006). Sin embargo, tiene que tenerse en cuenta que el APPCC puede ser una herramienta de gestión de riesgos difícil de aplicar ya que para los productos frescos es muy difícil identificar verdaderos Puntos de Control Crítico, a menos que se utilicen métodos que permite una reducción importante de patógenos, por ejemplo la irradiación (EFSA, 2011b).

De nuevo se recomienda la aplicación de estrategias de mitigación o de control reflejadas en las BPF y BPH en línea con las recomendaciones disponibles en organizaciones internacionales (CAC, 2003) (FAO/OMS, 2008). Para controlar la presencia de STEC en la etapa de manipulación y procesado es de gran importancia tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Usar agua de calidad microbiológica adecuada para el lavado.
- Garantizar una formación básica para los manipuladores de alimentos sobre las prácticas de higiene.
- Asegurar el diseño adecuado y gestión de la higiene de los locales destinados al almacenamiento y procesado de alimentos, incluyendo los planes de control de plagas.

Durante la venta de las frutas y hortalizas en supermercados y pequeños comercios es conveniente seguir las directrices de la FAO/OMS y la Comisión del *Codex Alimentarius* (CAC, 2003) (FAO/OMS, 2008). Es de vital importancia gestionar adecuadamente la cadena de frío, más allá de las buenas prácticas de fabricación en general y buenas prácticas higiénicas, incluidas las prácticas de higiene del personal en el manejo de los productos alimenticios. Esto es de particular interés para los productos transformados listos para el consumo (por ejemplo, verduras cortadas listas para su consumo, zumos procedentes de vegetales o frutas que no estén pasteurizados).

La utilización de las buenas prácticas higiénicas y de manipulación de frutas y hortalizas frescas, incluyendo la educación y la capacitación de los manipuladores de alimentos son importantes en las actividades de los centros de *catering* para el control de cepas STEC. A los consumidores se les recomienda seguir las Buenas Prácticas de Higiene en la preparación de alimentos, por ejemplo lavarse las manos antes y después de preparar alimentos, lavar todas las frutas y verduras con agua potable, evitar la contaminación cruzada, mantener la temperatura de refrigeración durante el almacenamiento. Pelar o cocinar las frutas y verduras también puede eliminar el riesgo de presencia de STEC. Algunos alimentos más resistentes, tales como vegetales de raíz se deberían lavar con un cepillo para la eliminación física de la tierra y los microorganismos. Esto se puede hacer en combinación con un detergente seguido de un enjuague con agua potable. No obstante, conviene decir que aunque estas medidas han demostrado su utilidad no es posible eliminar completamente el riesgo de presencia de STEC en frutas y hortalizas frescas.

Conclusiones del Comité Científico

Vías de contaminación de alimentos por STEC

1. Se han identificado muchos tipos diferentes de alimentos como una fuente potencial de STEC. Estos suelen ser alimentos crudos o mal cocinados y contaminados con heces de rumiantes, ya sea durante la producción primaria (por ejemplo, el ordeño, frutas, verduras y hortalizas frescas fertilizadas) o su posterior procesado y manipulación (por ejemplo, el sacrificio). Los brotes de infección

por STEC se asocian cada vez más a las frutas y hortalizas, sobre todo a las semillas germinadas y las verduras de hoja para ensaladas.

2. Puede existir más de una vía de exposición en los brotes. Por ejemplo, la infección humana primaria pueden tener su origen por el consumo de alimentos contaminados o contacto directo con un animal portador de STEC, mientras que una infección secundaria puede ocurrir por la vía fecal-oral, después de la contaminación de los alimentos debido a su manipulación por una persona infectada que excreta la bacteria con las heces. Como resultado es probable que existan múltiples vías de exposición, sobre todo durante las últimas etapas de un brote, incluyendo los portadores asintomáticos.
3. La contaminación de las carnes con STEC puede ocurrir en diferentes etapas de la cadena alimentaria: en la granja, en los mataderos, durante la manipulación y procesado, en la comercialización y venta al por menor, durante la preparación culinaria para suministro a terceros, así como después de la venta durante el transporte y en el ámbito doméstico por una mala manipulación por parte de los consumidores.
4. La contaminación de las frutas y hortalizas con STEC puede ocurrir en diferentes etapas de la cadena alimentaria: durante la producción primaria, durante la cosecha y post-cosecha, incluyendo el manejo y procesamiento, en la comercialización y venta al por menor y *catering* así como después de la venta durante el transporte y en el ámbito doméstico por una mala manipulación por parte de los consumidores. Puesto que las tecnologías actuales o prácticas aplicadas durante el procesado post-cosecha no eliminan eficazmente los microorganismos que contaminan a las frutas y hortalizas, los esfuerzos se deben dirigir fundamentalmente a la prevención de la contaminación tanto en pre-cosecha como en post-cosecha.

Medidas de control para evitar la contaminación y brotes por STEC

1. Las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y de Fabricación (BPF) son las primeras medidas a tener en cuenta en el control de STEC y otros microorganismos patógenos tanto en alimentos de origen animal como vegetal. Las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) describen las medidas preventivas que se deben aplicar en las operaciones agrícolas con objeto de reducir la contaminación del producto y proporcionar orientación sobre las prácticas agrícolas necesarias encaminadas a conseguir aumentar la inocuidad alimentaria desde el propio campo. La aplicación del sistema APPCC es una herramienta útil para prevenir la contaminación por STEC lo que puede contribuir a su disminución a nivel de granja o campo de cultivo. No obstante en producción primaria donde las circunstancias son tan imprevistas, estas pueden hacerlo en muchos casos poco apropiado. La incorporación de programas APPCC en las plantas de procesado y embalaje es un requisito indispensable para conseguir la máxima inocuidad alimentaria.
2. Puesto que hay evidencias de portadores asintomáticos de STEC, es importante la detección de las personas portadoras de STEC involucradas en el manejo de los alimentos. El seguimiento y/o la exclusión de los portadores de STEC relacionados con la manipulación de los alimentos se debe considerar como una opción de control.
3. El tipo de alimentación de los animales de granja parece estar en el origen de la contaminación de

los animales destinados al matadero, por lo que es esencial considerar el desarrollo de alimentos que disminuyan las excreción de *E. coli* por parte de dichos animales.

4. Es imprescindible usar agua de buena calidad microbiológica para la bebida de los animales y tomar las medidas necesarias para su higienización, como la cloración y evitar la presencia de materia orgánica. Asimismo, se debe usar agua para riego y para la agricultura en general de una calidad microbiológica adecuada. A nivel de planta de procesado y envasado posterior de vegetales frescos, se debe usar agua de calidad microbiológica adecuada para su lavado.
5. Es necesario evitar el acceso de animales de granja (rumiantes en particular) en el entorno inmediato de los campos de cultivo. Asimismo, se debe controlar la contratación, manejo y tratamiento de estiércol y purines que se van a utilizar para fertilizar los campos destinados al cultivo de frutas y hortalizas para al consumo humano.
6. El único método eficaz de eliminación de STEC de los alimentos es la introducción de un tratamiento bactericida, como el calentamiento (por ejemplo: cocción o pasteurización) o irradiación. No obstante, la combinación de varias tecnologías de conservación no térmica y térmica bajo el concepto de tecnologías de barrera, así como las tecnologías térmicas de calentamiento rápido, tales como microondas y radiofrecuencia o túneles de pasteurización por vapor ofrecen nuevas posibilidades para la pasteurización de los productos cárnicos, especialmente en los alimentos listos para su consumo.
7. El uso de agua caliente y lavado con ácido láctico y de vapor a presión para descontaminar las canales reduce de forma eficaz la contaminación con *E. coli* O157:H7. Estas técnicas de intervención para eliminar *E. coli* O157:H7 a partir de la superficie de la carne también han demostrado su eficacia contra O26:H11 y O111:H8. No obstante, y a pesar de los beneficios que su pone la utilización de ácido láctico para reducir la contaminación de la superficie microbiológica de las canales de vacuno o las medias canales o cuartos su uso no está permitido por los reglamentos en vigor, por consiguiente, la industria debe cumplir con los requisitos de la legislación de la Unión en materia de higiene alimentaria, según lo establecido en los Reglamentos (CE) Nº 852/2004, Nº 853/2004 y Nº 2073/2005. En cualquier caso, su uso siempre debería integrarse con las Buenas Prácticas de Higiene y sistemas basados en el APPCC y de ninguna manera debe considerarse como una sustitución de higiene para las prácticas de matanza y procedimientos de operación o como una alternativa para cumplir con los requisitos de dicho Reglamento.
8. Se debe garantizar una formación básica para los manipuladores de alimentos sobre las prácticas de higiene y de forma especial para matarifes y otros manipuladores en matadero y salas de despiece. Entre otros aspectos debe asegurarse y controlarse con especial incidencia el uso de cuchillos en el proceso de evisceración y su desinfección en agua caliente a las combinaciones de temperatura y tiempo que aseguren la misma. Del mismo modo en el proceso de evisceración deben controlarse de forma eficaz todas las maniobras que aseguren la no contaminación con material fecal de canales y vísceras. Los manipuladores de alimentos deben lavarse bien las manos después de cualquier contacto con las carnes crudas. Asimismo, hay que garantizar el diseño adecuado y gestión de la higiene de los locales destinados al almacenamiento y procesado de alimentos, incluyendo los planes de control de plagas. La gestión correcta de la cadena de frío

es de particular importancia para los productos frescos y elaborados listos para su consumo (por ejemplo, hortalizas cortadas, los zumos sin pasteurizar, frutas, verduras, derivados cárnicos).

9. Es necesario informar a la población de los riesgos asociados con el manejo inadecuado de los alimentos y la preparación. La carne y especialmente la carne picada, se deben cocinar durante un tiempo suficiente para inactivar a STEC. Es importante evitar la contaminación cruzada de los alimentos que se comen crudos (frutas y verduras) con carne cruda previamente a su cocinado. Se debe llevar a cabo una distribución adecuada de los alimentos en el refrigerador doméstico a fin de evitar que los líquidos de los alimentos (carne y pescado) destinados a consumirse cocinados goteen sobre alimentos que se consumen crudos o sin calentar (frutas y hortalizas). Se deben lavar cuidadosamente, en el entorno doméstico, las verduras que se comen crudas en ensaladas.
10. Debido a la posible presencia de STEC en leche cruda, sólo la leche sometida a un tratamiento térmico de pasteurización se puede considerar apta para el consumo en cuanto a la posibilidad de contener STEC.
11. Es de interés contar con datos sobre el nmp de *E. coli* por gramo para evaluar el nivel de contaminación fecal en los alimentos. No obstante, hay que indicar que los recuentos bajos del nmp de *E. coli* no garantizan la no presencia de STEC, en este sentido la PCR en tiempo real ó convencional y la tipificación por PFGE comparándolas con otras cepas y muy especialmente con las causantes de infecciones en seres humanos pueden ser de gran utilidad.

Referencias

Ackers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Rice, D.H., Barrett, T.J., Hutwagner, L., Griffin, P.M. y Slutsker, L. (1998). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *Journal Infectious and Disease*, 177, pp: 1588-1593.

Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C.P. y Ray, B. (1999). Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, pp: 4248-4251.

Aymerich, T., Picouet, P.A., y Monfort, J.M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78, pp: 114-129.

Berg, J.T., McAllister, S., Bach, R., Stiborn, D., Hancock, y LeJeune, J. (2004). *Escherichia coli* O157:H7 excretion by commercial feedlot cattle fed either barley-or corn-based finishing diets. *Journal of Food Protection*, 67, pp: 666-671.

Beuchat, L.R. y Ryu, J.H. (1997). Produce handling and processing practices. *Emerging Infectious Disease*, 3, pp: 459-465.

Beuchat, L.R., Nail, B.V., Adler, B.B. y Clavero, M.R. (1998). Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. *Journal of Food Protection*, 61, pp: 1305-1311.

Beutin, L. y Martin, A. (2012). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *Journal of Food Protection*, 75, pp: 408-418. Review.

Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A. y Bauwens, A. (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infection Disease*, 11, pp: 671-676.

Blanco, J. (2012). *Escherichia coli* enteroagregativa O104:H4-ST678 productora de Stx2a. ¡Diagnóstico microbiológico ya, de este y otros serotipos de STEC/VTEC! *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30 (2), pp: 84-89.

Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., González, E.A., Bernárdez, M.I., Alonso, M.P., Coira, A., Rodriguez, A., Rey, J., Alonso, J.M. y Usera, M.A. (2003). Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Experimental Biology and Medicine*, 228, pp: 345-351.

Blanco, J.E., Blanco, M., Alonso, M.P., Mora, A., Dahbi, G., Coira, M.A. y Blanco, J. (2004a). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, pp: 311-319.

Blanco, M., Blanco, J.E., Mora. A., Dahbi, G., Alonso, M.P., González, E.A., Bernárdez, M.I. y Blanco, J. (2004b) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). *Journal of Clinical Microbiology*, 42, pp: 645-651.

Blanco, M., Blanco J.E., Dhabi, G., Alonso, M.P., Mora, A., Coira, M.A., Madrid, C., Juárez, A., Bernárdez, M.I., González, E.A. y Blanco, J. (2006). Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *International Microbiology*, 9, pp: 103-110.

Bosilevac, J.M., Nou, X., Barkocy-Gallagher, G.A., Arthur, T.M. y Koohmaraie, M. (2006). Treatments using hot water instead of lactic acid reduce levels of aerobic bacteria and Enterobacteriaceae and reduce the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on preevisceration beef carcasses. *Journal of Food Protection*, 69, pp: 1808-1813.

Breuer, T., Benkel, D.H., Shapiro, R.L., Hall, W.N., Winnett, M.M., Linn, M.J., Neimann, J., Barrett, T.J., Dietrich, S., Downes, F.P., Toney, D.M., Pearson, J.L., Rolka, H., Slutsker, L. y Griffin, P.M. (2001). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerging Infectious Diseases*, 7, pp: 977-982.

CAC (2003). Comisión del *Codex Alimentarius*. Code of hygienic practice for fresh fruits and vegetables. Revision 2010 (new Annex III for Fresh Leafy Vegetables). CAC/RCP 53-2003. Disponible en: www.codexalimentarius.net/download/standards/10200/CXP_053e.pdf. [acceso: 8-10-12].

CDC (2006). Center for Disease Control and Prevention. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach-United States, September 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report* (MMWR), September 29, 55 (38), pp: 1045-1046.

CE (2002a). Comisión Europea. Report of the Scientific Committee on Food on risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out125_en.pdf. [acceso: 8-10-12].

CE (2002b). Comisión Europea. Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European Union and Norway in 2000. Publicación DG SANCO/927/2002. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/mr/mr08_en.pdf [acceso: 8-10-12].

Chun, H.H., Kim, J.Y., Lee, B.D., Yu, D.J. y Song, K.B. (2010). Effect of UV-C irradiation on the inactivation of inoculated pathogens and quality of chicken breasts during storage. *Food Control*, 21, pp: 276-280.

Cortés, C., De la Fuente, R., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Dhabi, G., Mora, A., Justel, P., Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J.C. y Orden, J.A. (2005). Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing Escherichia coli and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. *Veterinary Microbiology*, 110 (1-2), pp: 67-76.

Cutter, C.N. y Rivera-Betancourt, M. (2000). Interventions for the reduction of *Salmonella Typhimurium* DT 104 and Non-O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* on beef surfaces. *Journal of Food Protection*, 63, pp: 1326-1332.

ECDC/EFSA (2011). European Centre for Disease Prevention and Control/European Food Safety Authority. Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/166e.pdf. [acceso: 5-10-12].

EFSA (2007a). European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on the Biological Hazard on microbiological criteria and target based on risk analysis. *The EFSA Journal*, 462, pp: 1-29.

EFSA (2007b). European Food Safety Authority. Scientific opinion of the panel on Biological Hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *The EFSA Journal*, 579, pp: 1-61.

EFSA (2011a). European Food Safety Authority. Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. *The EFSA Journal*, 9 (6), pp: 2274.

EFSA (2011b). European Food Safety Authority. Statement summarising the Conclusions and Recommendations from the Opinions on the safety of Irradiation of Food adopted by the BIOHAZ and CEF Panels. *The EFSA Journal*, 9 (4), pp: 2107.

EFSA (2011c). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and trimmings. *The EFSA Journal*, 9 (7), pp: 2317.

EFSA/ECDC (2011). European Food Safety Authority/European Centre for Disease Prevention and Control. The European Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2009. *The EFSA Journal*, 9 (3), pp: 2090.

EFSA/ECDC (2012). European Food Safety Authority/European Centre for Disease Prevention and Control. The European Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2010. *The EFSA Journal*, 10 (3), pp: 2597.

Ewing, W.H. (1986). En libro: *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*, 4ª edición. Nueva York. Elsevier Science Publishing Co., Inc.

FAO/OMS (2008). Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report. *Microbiological Risk Assessment* Series, 14.

Feng, P.C., Jinneman, K., Scheutz, F. y Monday, S.R. (2011). Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, pp: 6699-6702.

Ferguson, D.D, Scheftel, J., Cronquist, A., Smith, K., Woo-Ming, A., Anderson, E., Knutsen, J., De, A.K. y Gershman, K. (2005). Temporally distinct *Escherichia coli* O157 outbreaks associated with alfalfa sprouts linked to a common seed source - Colorado and Minnesota, 2003. *Epidemiology and Infection*, 133, pp: 439-447.

Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., Heiden, M.A., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Kemper, M.J., Follin, F., Müller, L., King, L.A., Rosner, B., Buchholz, U., Stark, K., Krause, G.y el equipo de investigación del SUH (2011). Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *The New England Journal of Medicine*, 365, pp: 1771-1780.

Friedrich, A.W., Bielaszewska, M., Zhang, W.L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A. y Karch, H. (2002). *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *The Journal of Infectious Diseases*, 185, pp: 74-84.

Friesema, I., Sigmundsdottir, G., van der Zwaluw, K., Heuvelink, A., Schimmer, B., de Jager, C., Rump, B., Briem, H., Hardardottir, H., Atladottir, A., Gudmundsdottir, E. y van Pelt, W. (2008). An international outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, September-October 2007. *EuroSurveillance*, 13 (50), pp: 19065.

Friesema, I.H., Van de Kassteele, J., De Jager, C.M., Heuvelink, A.E. y Van Pelt, W. (2010). Geographical association between livestock density and human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infections. Epidemiology and Infection, 8, pp: 1-7.

FSAI (2005). Food Safety Authority of Ireland. Determination of product shelf life. *Guidance note*, 18, pp: 1-56.

Garmendia, J., Frankel, G. y Crepin, V.F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity*, 73, pp: 2573-2585. Review.

Garrido, P., Blanco, M., Moreno-Paz, M., Briones, C., Dahbi, G., Blanco, J., Blanco, J. y Parro, V. (2006). STEC-EPEC

oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clinical Chemistry*, 52, pp: 192-201.

Gelting, R.J., Baloch, M.A., Zarate-Bermudez, M.A. y Selman, C. (2011). Irrigation water issues potentially related to the 2006 multistate *E. coli* O157:H7 outbreak associated with spinach. *Agriculture Water Management*. doi:10.1016/j.agwat.2011.04.004.

Grant J., Wendelber, A.M., Wendel, A., Jepson, B., Torres, P., Smelser, C. y Rolfs, R.Y. (2008). Spinach associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreack, Utha and New Mexico, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, 10, pp: 1633-1636.

Guinée, P.A.M., Jansen, W.H., Wadström, T. y Sellwood, R. (1981). *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. En libro: *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig diarrhoea, Current Topics in Veterinary and Animal Science*. La Haya. Leeww, P.W. y Guinée, P.A.M. Martinus-Nijhoff Pub., pp: 126-162.

Gyles, C.L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*, 85 (13 Suppl), pp: E45-62.

Hayakawa, I., Kanno, T., Yoshiyama, K. y Fujio, Y. (1994). Oscillatory compared with continuous high pressure sterilization on Bacillus steatothermophilus spores. *Journal of Food Science*, 59, pp: 164-167.

Hilborn, E.D., Mermin, J.H., Mshar, P.A., Hadler, J.L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M.A., Farrar, J.A., Glynn, M.K. y Slutsker, L. (1999). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Archives International Medicine*, 159, pp: 1758-1764.

Ibarra-Sanchez, L.S., Alvarado-Casillas, S., Rodriguez-Garcia, M.O., Martinez-Gonzales, N.E. y Castillo, A. (2004). Internalization of bacterial pathogens in tomatoes and their control by selected chemicals. *Journal of Food Protection*, 67, pp: 1353-1358.

Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kudo, Y., Saito, N., Noguchi, Y., Konuma, H. y Kumagai, S. (1998). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, pp: 1532-1535.

Johnson, R.P., Gyles, C.L., Huff, W.E., Ojha, S., Huff, G.R., Rath, N.C. y Donoghue, A.M. (2008). Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry, and pigs. *Animal Health Research Reviews*, 9, pp: 201-215.

Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K. y Kaper, J.B. (2003). Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing Escherichia coli seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *Journal Clinical Microbiology*, 41, pp: 4930-4940.

Kaspar, C., Doyle, M.E. y Archer, J. (2009). Food Safety Review: non-O157:H7 Shiga toxin-producing *E. coli* from meat and non-meat sources. Food Research Institute, UW-Madison. Disponible en: http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI_Brief_NonO157STEC_4_10.pdf [acceso: 17-10-12].

Koohmaraie, M., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Guerini, M., Shackelford, S.D. y Wheeler, T.L. (2005). Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science*, 71, pp: 79-91.

Lee, S. (2004). Microbial safety of picled fruit and vegetables and hurdle technology. Internet *Journal of Food Safety*, 4, pp: 21-32.

LeJeune, J.T. y Wetzel, A.N. (2007). Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle. *Journal Animal Science*, 85, pp: E73-E80.

Loneragan, G.H. y Brashears, M.M. (2005). Pre-harvest interventions to reduce carriage of *E. coli* O157 by harvest-ready feedlot cattle. *Meat Science*, 71, pp: 72-78.

Martin, A, y Beutin, L. (2011). Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *International Journal of Food Microbiology*, 146, pp: 99-104.

Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A. y Yanagawa, H. (1999). Massive out-

break of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology*, 150, pp: 787-796.

Miko, A., Pries, K., Haby, S., Steege, K., Albrecht, N., Krause, G. y Beutin, L. (2009). Assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wildlife meat as potential pathogens for humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, pp: 6462-6470.

Mohle-Boetani, J.C., Farrar, J.A., Werner, S.B., Minassian, D., Bryant, R., Abbott, S., Slutsker, L. y Vugia, D.J. (2001). *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* infections associated with sprouts in California, 1996-1998. *Annals of Internal Medicine*, 135, pp: 239-247.

Mora, A., Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., López, C., Justel, P., Alonso, M.P., Echeita, A., Bernárdez, M.I., González, E.A. y Blanco, J. (2007). Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. *BMC Microbiology*, 7, pp: 13.

Mora, A., Blanco, M., Yamamoto, D., Dahbi, G., Blanco, J.E., López, C., Alonso, M.P., Vieira, M.A., Hernandes, R.T., Abe, C.M., Piazza, R.M., Lacher, D.W., Elias, W.P., Gomes, T.A. y Blanco, J. (2009). HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. *International Microbiology*, 12, pp: 243-251.

Mora, A., Herrrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J.M., Alonso, M.P., Llovo, J., Bernárdez, M.I., Blanco, J.E., Blanco, M. y Blanco, J. (2011). Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *International Microbiology*, 14, pp: 121-141. Review.

Mora, A., López, C., Dhabi, G., López-Beceiro, A.M., Fidalgo, L.E., Díaz, E.A., Martínez-Carrasco, C., Mamani, R., Herrera, A., Blanco, J.E., Blanco, M. y Blanco, J. (2012). Seropathotypes, phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, pp: 2578-2585.

Nataro, J.P. y Kaper, J.B. (1998). Diarrheagic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology Reviews*, 11 (1), pp: 142-201.

OMS (1998). Organización Mundial de la Salud. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/surface_decon.pdf. [acceso: 17-10-12].

OMS (2005). Organización Mundial de la Salud. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Disponible en: http://www.who.int/factseets/fs125/en [acceso: 17-10-12].

OMS (2008). Organización Mundial de la Salud. Foodborne Disease Outbreak. Guidelines for investigation and control. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241547222_eng.pdf [acceso: 17-10-12].

Orden, J.A., Cortés, C., Horcajo, P., De la Fuente, R., Blanco, J.E., Mora, A., López, C., Blanco, J., Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J.C. y Domínguez-Bernal, G. (2008). A longitudinal study of verotoxin-producing *Escherichia coli* in two dairy goat herds. *Veterinary Microbiology*, 132 (3-4), pp: 428-434.

Orskov, F. y Orskov, I. (1984). Serotyping of *Escherichia coli*. En libro: *Methods in Microbiology* volumen 14. Bergan, T. Nueva York. Academic Press, pp: 43-112.

Riley, L.W., Remois, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Herbert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A. y Cohen, M.A. (1983). Hemorrahagic colitis associated with a rare *Escerichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine*, 308 (12), pp: 681-685.

Sánchez, S., García-Sánchez, A., Martínez, R., Blanco, J., Blanco, J.E., Blanco, M., Dahbi, G., Mora, A., Hermoso de Mendoza, J., Alonso, J.M. y Rey, J. (2009). Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than Escherichia coli O157:H7 in wild ruminants. *The Veterinary Journal*, 180, pp: 384-388.

Sánchez, S., Martínez, R., García, A., Vidal, D., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Herrera-León, S., Echeita, A., Alonso, J.M. y Rey, J. (2010). Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Veterinary Microbiology*, 143, pp: 420-423.

SCVPH (2003). Scientific Committee on veterinary measures relating to public health. Opinion of the Scientific

Committee on veterinary measures relating to public health on verotoxigenic *E. Coli* (VTEC) in foodstuffs. 21-22 January.

Silvestro, L., Caputo, M., Blancato, S., Decastelli, L., Fioravanti, A., Tozzoli, R., Morabito, S. y Caprioli, A. (2004). Asymptomatic carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in farm workers in Northern Italy. *Epidemiology Infection*, 132, pp: 915-919.

Söderström, A., Lindberg, A. y Andersson, Y. (2005). EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. *EuroSurveillance*, 10 (38), pii=2794.

Stephan, R., Ragettli, S. y Untermann, F. (2000). Prevalence and characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland. *Journal Applied Microbiology*, 88, pp: 335-341.

Tyrrel, S.F., Knox, J.W. y Weatherhead, E.K. (2006). Microbiological water quality requirements for salad irrigation in the United Kingdom. *Journal of Food Protection*, 69, pp: 2029-2035.

UE (1998). Unión Europea. Decisión nº 2119/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 24 de septiembre de 1998, por la que se crea una red de vigilancia epidemiológica y de control de las enfermedades transmisibles en la Comunidad. DO L 68 de 3 de octubre de 1998, pp: 1-7.

UE (2005). Unión Europea. Reglamento (CE) Nº 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: 1-26.

UE (2007). Unión Europea. Reglamento (CE) Nº 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO L 322 de 7 de diciembre de 2007, pp: 12-29.

UE (2009). Unión Europea. Decisión de la Comisión de 2 de abril de 2009 que modifica la Decisión 2000/96/CE en lo relativo a las redes especializadas de vigilancia de las enfermedades transmisibles. DO L 97 de 3 de abril de 2009, pp: 27-30.

USFDA (2001) U.S. Food and Drug Administration. Hazard Analysis and Critical Control Point (HAACP); Procedures for the Safe and Sanitary Processing and Importing of Juice. *Federal Register*, 66 (13), pp: 6137-6202.

Wells, J.E., Shackelford, S.D., Berry, E.D., Kalchayanand, N., Guerini, M.N., Varel, V.H., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Freetly, H.C., Wheeler, T.L., Ferrell, C.L. y Koohmaraie, M. (2009). Prevalence and level of *Escherichia coli* O157:H7 in feces and on hides of feedlot steers fed diets with or without wet distillers grains with soluble. *Journal of Food Protection*, 72, pp: 1624-1633.

Wendel, A.M., Johnson, D.H., Sharapov, U., Grant, J., Archer, J.R., Monson, T., Koschmann, C. y Davis, J.P. (2009). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August-September 2006: the Wisconsin investigation. *Clinical Infectious Dissease*, 48, pp: 1079-1086.

Zhao, T., Doyle, M.P., Harmon, B.G., Brown, C.A., Mueller, P.O.E. y Parks, A.H. (1998). Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *Journal Clinical Microbiology*, 36, pp: 641-647.

Zhao, T., Zhao, P., West, J.W., Bernard, J.K., Cross, H.G. y Doyle. M.P. (2006). Inactivation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in rumen content-or feces-contaminated drinking water for cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, pp: 3268-3273.

Colaboración

Técnica de cribado con Cinco Placas para la detección de residuos de antibióticos

P. Diez, E. Medina*, M. Martín** y V. Calderón

Centro Nacional de Alimentación. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

*Beca de Formación de la AESAN.

**Tragsatec.

Resumen

La técnica de cribado con Cinco Placas es una técnica microbiológica de difusión en agar para la detección de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal y otras matrices. En ella las muestras analíticas se aplican sobre placas de ensayo que contienen diferentes bacterias inoculadas en medios de cultivo de diferente pH. Las sustancias antibacterianas presentes en las muestras difunden alrededor de ellas provocando la aparición de zonas de inhibición del crecimiento del microorganismo.

Palabras clave

Residuos de antibióticos, inhibición bacteriana, técnica de cribado.

Five plate screening test for the detection of antibiotic residues.

Abstract

The five plate screening test is a microbiological agar diffusion test for the detection of antibiotic residues in foods of animal origin and other matrices. Samples are assayed on test plates containing different microorganisms inoculated into culture media with different pH values. Antibacterial substances present in the samples diffuse around them leading to bacterial growth inhibition zones.

Key words

Antibiotic residues, bacterial inhibition, screening test.

Objetivo

El objetivo principal de esta técnica es la detección de residuos de antibacterianos en alimentos de origen animal. Se trata de una técnica cualitativa de cribado con la que únicamente se pretende detectar la presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano. Un resultado positivo indica la presencia en la muestra de un inhibidor del crecimiento bacteriano cuya naturaleza y concentración debe establecerse mediante técnicas más específicas.

La técnica se aplica, principalmente, a muestras de músculo y riñón pero es posible aplicarla a otras matrices tales como leche, huevos, pienso, etc. En cada caso deberá valorarse la utilidad de la técnica en función del uso previsto, por ejemplo, esta técnica no es adecuada para alcanzar los límites de detección requeridos para los residuos de sulfamidas en matrices como músculo o riñón pero puede ser de utilidad para su detección en pienso.

Introducción

Los antibióticos se utilizan en el tratamiento de múltiples enfermedades infecciosas de los animales productores de alimentos. Se trata de un uso legal muy extendido que requiere cesar el tratamiento antes del sacrificio del animal o de la recogida de su producción para evitar que aparezcan residuos peligrosos para el consumidor. Estos residuos pueden provocar efectos tóxicos, fundamentalmente alergias, y pueden interferir en la fabricación de alimentos como el queso, el yogur o los embutidos en cuya producción intervengan cultivos bacterianos.

Con el fin de proteger al consumidor y facilitar el libre intercambio de alimentos en la Unión Europea, existe una legislación que establece, por un lado limites máximos de residuos a través del Reglamento (CE) Nº 470/2009 (UE, 2009) y el Reglamento (UE) Nº 37/2010 (UE, 2010) y, por otro, medidas de control sanitario a través de la Directiva 96/23 (UE, 1996) y de su transposición en el Real Decreto 1749/98 que establece las bases del Plan Nacional de Investigación de Residuos (PNIR).

El objetivo del Plan de Investigación de Residuos es detectar cualquier tratamiento ilegal y comprobar si los residuos de medicamentos veterinarios cumplen con los límites máximos de residuos establecidos.

Una de las características específicas del control sanitario de los residuos de antibióticos es la necesidad de verificar si el contenido de residuo en el alimento supera el límite máximo establecido y, por ello, es potencialmente peligroso para el consumidor. No basta, por tanto, con saber que en un alimento está presente un inhibidor del crecimiento bacteriano sino que hay que identificarlo y cuantificarlo. Dado que hay que realizar el control de un gran número de compuestos en muchas muestras y alimentos distintos, es necesario diseñar una estrategia analítica para el análisis de cada residuo o grupo de residuos que puede incluir las fases de cribado, post-cribado y confirmación. La relativa inespecificidad de las técnicas microbiológicas hace que su utilidad esté en las fases de cribado y post-cribado antes de pasar a la confirmación definitiva.

En general, las técnicas microbiológicas de cribado por inhibición del crecimiento bacteriano utilizadas en el control sanitario de residuos de antibióticos se basan en enfrentar un cultivo bacteriano de una cepa estandarizada sensible a determinados antibióticos, con una porción o un extracto de la muestra a analizar. Si la muestra contiene un antibiótico, éste producirá una inhibición del crecimiento del microorganismo que puede observarse a través de la aparición de halos de inhibición del crecimiento bacteriano

o de la alteración de procesos metabólicos que evitan, por ejemplo, la acidificación del medio de cultivo o la reducción de un colorante. Esta detección puede verse incrementada por la presencia de productos como la trimetoprima en el caso de las sulfamidas, por el uso de microorganismos sensibles o por la adaptación del pH del medio de cultivo al óptimo de cada antibiótico. Cuando se utilizan placas de ensayo, la presencia de residuos de antibiótico se manifiesta por la aparición de halos de inhibición alrededor de la muestra cuyo tamaño se puede medir.

La Técnica de las Cinco Placas es la técnica microbiológica de cribado más ampliamente utilizada en España para la detección de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal. Está basada en el método publicado por R. Bogaerts y F. Wolf en 1980, que sólo utilizaba cuatro placas y al que se le ha añadido una quinta placa inoculada con *Escherichia coli*.

Se trata de una técnica de cribado económica, sencilla y multirresiduo que permite analizar un gran número de muestras.

Materiales y método

1. Preparación de medios de cultivo

- Agar de ensayo para sustancias inhibidoras de pH 6 (Merck Nº 10663 o equivalente): pH 6 ± 0,1

  Agua destilada: 1 L
  Peptona de caseína: 3,45 g
  Peptona de carne: 3,45 g
  NaCl: 5,1 g
  Agar: 13 g
  Esterilización en autoclave: 15 minutos, (121 ± 2) ºC

- *Diagnostic Sensitivity Test* (Oxoid Nº CM261 o equivalente): pH 7,4 ± 0,1 (DST)

  Agua destilada: 1 L
  Proteosa peptona: 10 g
  Sólidos de infusión de ternera: 10 g
  Glucosa: 2 g
  Sulfato de adenina: 0,01 g
  Clorhidrato de guanina: 0,01 g
  Uracilo: 0,01 g
  Cloruro sódico: 3 g
  Xantina: 0,01 g
  Fosfato disódico: 2 g
  Acetato sódico: 1 g
  Aneurina: 0,00002 g
  Agar: 12 g
  Esterilización en autoclave: 15 minutos, (121 ± 2) ºC

- Agar de ensayo para sustancias inhibidoras de pH 8 (Merck Nº 10664 o equivalente): pH 8 ± 0,1
  Agua destilada: 1 L
  Peptona de caseína: 3,45 g
  Peptona de carne: 3,45 g
  NaCl: 5,1 g
  Fosfato trisódico: 2,4 g
  Agar: 13 g
  Esterilización en autoclave: 15 minutos, (121 ± 2) ºC

2. Microorganismos

- *Bacillus subtilis* BGA (suspensión de 10^7 esporas/ml, Merck Nº 10649, equivalente a CECT 482).
- *Kocuria rhizophila* CECT 241 (equivalente a ATCC 9341).
- *Escherichia coli* CECT 4201 (equivalente a ATCC 11303).

Las suspensiones de esporas son muy estables en refrigeración, pero no ocurre lo mismo con las formas vegetativas por lo que se puede recurrir a su congelación para prolongar la vida útil y facilitar la preparación de placas de ensayo (Díez et al., 1994).

3. Preparación de reactivos

- Ácido acético 5%: 5 ml de ácido acético (Merck Nº 62 o equivalente) diluidos hasta 100 ml con agua destilada.
- Tampón fosfato 0,1 M pH 7: 0,5 g de KH_2PO_4 (Merck 4873 o equivalente) + 1,1 g de K_2HPO_4 (Merck 5104 o equivalente) en 100 ml de agua destilada. Esterilización en autoclave: 15 minutos a 121 ºC.
- Trimetoprima 30 µg/ml: Disolver el patrón de trimetoprima en ácido acético 5% hasta conseguir una solución de 1.000 µg/ml y diluir con agua destilada hasta 30 µg/ml. La solución de 30 µg/ml se puede conservar en congelación durante seis meses.

4. Patrones y materiales de referencia

- Discos control de antibiótico de 6 mm de diámetro:
  Bencilpenicilina 0,01 UI/disco (Mast PG0.01C o equivalente).
  Sulfadimidina 0,5 µg/disco (Mast SD0.5 C o equivalente).
  Estreptomicina 0,5 µg/disco (Mast S0.5 C o equivalente).
  Ciprofloxacino 0,003 µg/disco (Mast CIP0.003 o equivalente).
- Patrones de antibiótico:
  Bencilpenicilina (Sigma PEN-NA o equivalente).
  Sulfadimidina (Sigma S 6256 o equivalente).
  Estreptomicina (Sigma S 6501 o equivalente).
  Ciprofloxacino (Fluka 17850 o equivalente).

5. Preparación de placas

Preparación de placas con *B. subtilis* BGA

Para preparar las placas con *B.subtilis* BGA (CECT 482), se inocula el microorganismo (suspensión de esporas de *B. subtilis* BGA, 10^7 esporas/ml) en los medios de cultivo de pH 6, DST y pH 8 de manera que se obtenga una concentración final de, aproximadamente, 10^4 esporas por mililitro de medio.

Normalmente eso supone añadir 100 µl de suspensión por cada 100 ml de medio aunque puede ser necesario hacer ajustes para obtener el tamaño adecuado del halo del disco control.

En la placa con medio DST debe añadirse, además, una solución de trimetoprima con el fin de alcanzar una concentración final de 0,03 µg por ml de medio de cultivo (100 µl de una solución 30 µg/ml de trimetoprima por cada 100 ml de medio de cultivo).

Para preparar las placas con *K.rhizophila* CECT 241 (ATCC 9341) se debe inocular el microorganismo en el medio de cultivo de pH 8 de manera que se obtenga una concentración final de 10^4 unidades formadoras de colonias (ufc) por mililitro de medio.

Para preparar las placas con *E.coli* CECT 4201 (ATCC 11303) se debe inocular el microorganismo en el medio de cultivo de pH 8 de manera que se obtenga una concentración final de 10^5 unidades formadoras de colonias (ufc) por mililitro de medio.

La cantidad de suspensión de microorganismo a añadir depende de su concentración y además, como se ha mencionado anteriormente, puede ser necesario hacer ajustes para obtener el tamaño adecuado del halo del disco control. Se pueden utilizar suspensiones congeladas o cultivos recientes del microorganismo.

El medio de cultivo se puede licuar en microondas y atemperar en un baño de agua cuya temperatura no debe superar los 55 ºC. La inoculación puede hacerse en un matraz estéril o en la propia placa. Se debe agitar bien para asegurar una adecuada homogeneización del microorganismo en el medio.

El medio de cultivo inoculado se dispensa en las placas de manera que se obtenga una capa de, aproximadamente, 2 mm de espesor, lo que supone añadir 10 ml en placas de 90 mm de diámetro, 25 ml en placas de 140 mm de diámetro y 80 ml en placas de 243 mm x 243 mm.

Por último, se deja solidificar sobre una superficie plana perfectamente horizontal. Las placas de *K.rhizophila* y *E.coli* se pueden conservar en refrigerador durante, aproximadamente, tres días, y las de *B.subtilis* unos cuatro días.

Control de calidad

Como control de calidad en la preparación de series sucesivas de placas se utilizan discos de antibiótico o sulfamida de 6 mm de diámetro. Así, en el centro de la placa de *B.subtilis* BGA con agar de pH 6 se situará un disco con 0,01 UI de bencilpenicilina, en la de *B.subtilis* BGA con medio DST un disco con 0,5 µg de sulfadimidina y en las placas con agar de pH 8, tanto de *B.subtilis* BGA como de *K.rhizophila*, un disco con 0,5 µg de estreptomicina. Por último en las placas de *E.coli* se utilizan discos de ciprofloxacino de 0,003 µg/disco.

Estos discos pueden obtenerse comercialmente o pueden prepararse en el laboratorio. En este último caso se deben impregnar discos de papel de 6 mm de diámetro con 10 µl de las siguientes soluciones:

- PEN: Disco Bencilpenicilina 0,01 UI/disco: 10 µl de una solución de 1 UI/ml.
- SDM: Disco Sulfadimidina 0,5 µg/disco: 10 µl de una solución de 50 µg/ml.
- STR: Disco Estreptomicina 0,5 µg/disco: 10 µl de una solución de 50 µg/ml.
- CIP: Disco de Ciprofloxacino 0,003 µg/disco: 10 µl de una solución de 0,3 µg/ml.

Una vez aplicado el antibacteriano se procede al uso del disco en la placa correspondiente o a su desecación para conservarlos durante algún tiempo. Los discos con antibacterianos se conservan, una vez desecados, en refrigerador. Para desecarlos se mantienen extendidos sobre una placa Petri marcada con su sigla en una estufa de cultivo o de desecación a 37 ºC durante 30 minutos. Para conservarlos se introducirán en un tubo de plástico cerrado con un tapón que evite la entrada de humedad.

El periodo máximo de conservación varía en función del antibacteriano y la forma de conservación. Por ejemplo, para los discos de los siguientes antibacterianos los periodos de caducidad aproximada en refrigerador son:

- PEN: Bencilpenicilina 0,01 UI/disco: dos semanas.
- SDM: Sulfadimidina 0,5 µg/disco: un mes.
- STR: Estreptomicina 0,5 µg/disco: un mes.
- CIP: Ciprofloxacino 0,003 µg/disco: un mes.

Toma de muestra

Para realizar la toma de muestras de tejidos (músculo, riñón) y productos de acuicultura se utiliza un sacabocados estéril de 8 mm de diámetro interno. Con él se extraen cilindros de, al menos, dos lugares distintos de la muestra previamente congelada.

Los cilindros de tejido se cortan en discos de 2 mm de anchura con un bisturí estéril. Es necesario cambiar de sacabocados y de bisturí con cada muestra.

Si se trata de muestras de pienso, éstas se tienen que mezclar con agua destilada estéril hasta obtener una masa. La cantidad de agua a añadir depende de las características del pienso, por lo que conviene empezar con la proporción 1:1 y aumentar hasta que el pienso adquiera una consistencia pastosa.

Las muestras de huevo se homogeneizan en un homogeneizador de palas y después se calientan en un baño de agua a 70 ± 2 ºC durante 20 minutos para inactivar los inhibidores naturales.

Los productos zoosanitarios en polvo requieren una mezcla con líquido para facilitar su aplicación en las placas. Para ello, se adiciona agua destilada en una proporción tal que permita obtener un fluido con el que rellenar los pocillos excavados en las placas.

Operaciones de análisis

Una vez realizada la toma de muestras se procede a su colocación en las placas de ensayo. Los discos de 2 mm de ancho de las muestras de tejidos y productos de acuicultura se sitúan por duplicado en cada una de las cinco placas.

Si la muestra es de riñón de cerdo hay que colocar una porción de membrana de celulosa entre el medio de cultivo y la muestra con el fin de evitar la acción de los inhibidores naturales del tejido

(Calderón et al., 1992). La mitad de la muestra quedará situada sobre el medio y la otra mitad sobre la membrana.

Para muestras de pienso, leche, huevo tratado con calor y productos zoosanitarios (líquidos o sus homogeneizados) se excavan pocillos de 8 mm de diámetro con un sacabocados y se rellenan con las muestras. El pocillo se perforará hasta el fondo del medio de cultivo una vez que éste se ha solidificado en la placa. En el caso de la leche es necesario utilizar, además, técnicas de cribado por inhibición de *B.stearothermophilus*.

Una vez que las muestras ya están colocadas en las placas se procede a su incubación. Las placas de *B.subtilis* y *E.coli* se incuban a 30 ± 2 ºC y las de *K.rhizophila* a 37 ± 2 ºC durante 18 a 24 horas.

Tratamiento de resultados

Tras la incubación se comprueba la aparición de zonas de inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor de las muestras y alrededor de los discos control. Cuando los discos control den lugar a un halo de inhibición de al menos 4 mm de anchura en las placas de *K.rhizophila* y 6 mm en las demás se considerará que el funcionamiento de las placas ha sido correcto. La lectura de los halos de inhibición se realizará más fácilmente con un calibrador digital y un negatoscopio como fuente de luz, aunque también se puede utilizar un lector de halos o incluso una regla milimetrada. En cualquier caso, es importante que el sistema de medida esté lo más estandarizado posible de modo que siempre se mida en las mismas condiciones (Calderón et al., 1995).

El resultado del ensayo será positivo si se producen zonas de inhibición de, al menos, (≥) 2 mm de anchura (desde el borde de la muestra al borde de la zona de inhibición) en una o más placas. Si no es así, el resultado es negativo.

En el caso del riñón de cerdo congelado, la lectura del halo de inhibición se realizará tanto por la zona en la que la muestra está en contacto con el medio de cultivo como por la zona en la que está en contacto con la membrana, que será la que determine el resultado final.

La expresión del resultado es: positivo o negativo a la presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano.

Aunque con esta técnica no es posible identificar el antibacteriano presente en la muestra analizada, sí se puede comparar el tamaño de los halos de inhibición obtenidos con el perfil de actividad de distintos antibióticos estudiados (Calderón, 2000). Los distintos grupos de antimicrobianos presentan diferencias en cuanto a sus perfiles de actividad en las cinco placas utilizadas. Así, las tetraciclinas causan las mayores zonas de inhibición en la placa de pH 6; los betalactámicos en las placas de *K.rhizophila* y, en algunos casos, en la placa de pH 6; los aminoglucósidos en la placa de pH 8; y los macrólidos en la placa con *K. rhizophila*. Las fluoroquinolonas básicas se detectan de forma similar en las tres placas de *B.subtilis* y su detección mejora en la placa con *E.coli*. Por el contrario, el resto de las quinolonas causan los mayores halos en las placas de pH 6.

Referencias

Bogaerts, R. y Wolf, F. (1980). A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtschaft*, 60, pp: 672-673.

Calderón, V. (2000). Tesis: Control sanitario de residuos de antibióticos en carnes por métodos microbiológicos. Directores: Joaquín Berenguer y Mª del Carmen de la Rosa. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Centro Nacional de Alimentación. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo.

Calderón, V., Berenguer, J.A., González, J. y Díez, P. (1992). Análisis de residuos de antibióticos y sulfamidas en productos cárnicos mediante la utilización de una membrana de celulosa aplicada a la técnica de cribado de las cuatro placas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, CSIC. 32 (3), pp: 331-339.

Calderón, V., Díez, P., González, J., Calderón, R. y Berenguer, J.A. (1995). Measurement of inhibition zones in antibiotic residue assays. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 46 (6).

Díez, P., Calderón, V., Berenguer, J.A. y Uruburu, F. (1994). Preservation of cultures of vegetative cells for use in antibiotic residue assays. *Food Microbiology*. 11 (1), pp: 1-4.

Real Decreto 1749/98 de 31 de julio de 1998, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. BOE 188 de 7 de agosto de 1998, pp: 26910-26975.

UE (1996). Directiva 96/23 de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. DO L 125 de 23 de mayo de 1996, pp: 10-32.

UE (2009). Reglamento (CE) Nº 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal. DO L 152 de 16 de junio de 2009, pp: 11-22.

UE (2010). Reglamento (UE) Nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. DO L 15 de 20 de enero de 2010, pp: 1-72.

Colaboración

Validación del método de cribado de las Cinco Placas para detección de residuos de antibióticos en alimentos. Estimación del límite de detección

P. Diez, E. Medina*, M. Martín** y V. Calderón

Centro Nacional de Alimentación. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

*Beca de Formación de la AESAN.

**Tragsatec.

Resumen

La técnica de cribado de las Cinco Placas es una técnica microbiológica sencilla y de bajo coste que se utiliza ampliamente en España para la detección de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal.

En este trabajo se describen los criterios utilizados para validar esta técnica y los resultados obtenidos en distintas matrices: músculo de porcino, bovino, ovino y ave, riñón de bovino, leche, huevo y pescado, siguiendo los criterios establecidos por la Decisión 2002/657/CE.

Los resultados obtenidos suponen sólo una estimación respecto a los límites de detección de esta técnica dado que sólo la utilización de muestras de tejido íntegro, tal como se emplean en esta técnica, que contuvieran antibióticos permitiría una estimación precisa de los límites de detección. Además, la estimación se ha realizado con un margen de seguridad muy elevado ya que sólo se han considerado halos de inhibición perfectamente visibles.

La validación de la técnica de cribado de residuos de antibióticos realizada conforme a las directrices de la Decisión 2002/657/CE ha demostrado que, aunque para algunos residuos de antibióticos la detección se realiza a niveles superiores, esta técnica permite detectar un cierto número de antibióticos en diversos alimentos al nivel o por debajo de su límite máximo de residuos y, por tanto, es válida para el uso previsto.

Palabras clave

Validación, residuos de antibióticos, cribado, límite de detección.

Validation of a five plate test for the screening of antibiotic residues in food. Estimation of the limit of detection.

Abstract

The five plate test is a simple and low cost microbiological screening technique widely used in Spain for the detection of antibiotic residues in foods of animal origin.

This work describes the criteria used to validate this technique and the results obtained in different matrices: porcine, bovine, ovine and poultry muscle, bovine kidney, milk, egg and fish, according to criteria established by Commission Decision 2002/657/EC.

The results obtained are just an estimate of the detection limits of this technique, given that a precise estimation of the detection limits would be only allowed by the use of whole tissue samples containing antibiotics, as is the case of the tissue samples analyzed with this technique. In addition, the estimate was made using a very high safety margin since only perfectly visible inhibition zones were considered.

Validation of the antibiotic residue screening technique in accordance with Decision 200/657/EC, despite some antibiotics being detected at higher levels, has demonstrated that the technique allows for detection of a certain number of antibiotics in various foods at or below the maximum residue level. It is therefore valid for the intended purpose.

Key words

Validation, antibiotic residues, screening, limit of detection.

Introducción

El uso de medicamentos veterinarios para el tratamiento de enfermedades de los animales destinados a consumo humano es una práctica legal ampliamente extendida. Estos animales no deben sacrificarse y su producción de alimentos no se debe utilizar hasta que se cumpla un periodo desde que finaliza la administración del medicamento, con el fin de que se eliminen sus residuos. Por ello, si no se respetan los llamados tiempos de espera o periodos de supresión, es posible que aparezcan residuos de estos medicamentos en los alimentos.

El principal problema sanitario causado por la presencia de los residuos de antibióticos en los alimentos es el de su toxicidad, especialmente reacciones alérgicas como las causadas, por ejemplo, por las penicilinas. Además, estos residuos tienen consecuencias tecnológicas ya que pueden interferir en los procesos de producción de alimentos en los que intervienen cultivos bacterianos (queso, yogur, embutidos). Por otra parte, al igual que sucede en la población humana, una mala utilización de los antibióticos favorece la aparición de resistencias bacterianas.

Como consecuencia de los efectos adversos que pueden producir los residuos de medicamentos veterinarios en alimentos, se han establecido en la Unión Europea Límites Máximos de Residuos (LMR) en los alimentos de origen animal. Así, el Reglamento (CE) Nº 470/2009 (UE, 2009), establece un procedimiento comunitario para la fijación de los límites máximos de residuos de sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal.

En la Unión Europea el control sanitario de los residuos de medicamentos veterinarios en alimentos se realiza en el marco establecido por la Directiva 96/23/CE (UE, 1996), transpuesta al ordenamiento jurídico español a través del Real Decreto 1749/1998 por el que se establecen las bases del Plan Nacional de Investigación de Residuos (PNIR). Este plan dispone las medidas de control aplicables respecto a determinadas sustancias y sus residuos en animales vivos y sus productos destinados a consumo humano. Su objetivo principal es la detección de cualquier tratamiento ilegal y la comprobación de que los residuos de medicamentos veterinarios se encuentran por debajo del LMR correspondiente.

Las técnicas de cribado juegan un importante papel en la detección de residuos de antibióticos ya que el número de muestras, de antibióticos y de matrices diferentes a controlar es elevado. Una técnica de cribado permite seleccionar de una forma sencilla y económica aquellas muestras que podrían contener residuos de antibióticos.

En caso de obtenerse resultados positivos a la técnica de cribado, se deben utilizar técnicas fisicoquímicas más específicas para confirmar y cuantificar el residuo.

En España muchos laboratorios utilizan la técnica de cribado de residuos de antibióticos de las Cinco Placas, que es un método de análisis microbiológico sencillo y de bajo coste. Se basa en la inhibición del crecimiento de cultivos bacterianos en placa para detectar la actividad antibacteriana de los residuos de antibióticos presentes en los alimentos.

El método de cribado de las Cinco Placas fue desarrollado inicialmente como un método de detección de residuos de antibióticos con cuatro placas (Bogaerts y Wolf, 1980) y su utilización ha sido muy amplia en Europa. Posteriormente se añadió una quinta placa que mejora la detección del grupo de las quinolonas gracias a la mayor sensibilidad de una cepa de *Escherichia coli* (Ellerbroek, 1991). Este método permite, con distintas modificaciones, la detección de residuos de antibióticos en diversos

alimentos de origen animal tales como músculo, riñón, leche y huevos y en piensos. Se han publicado estudios de evaluación del límite de detección de métodos similares (Currie et al., 1998) o alternativos (Gaudin et al., 2010).

Los métodos analíticos utilizados para el análisis de muestras de control oficial de residuos deben ser validados de acuerdo a la Decisión 2002/657/CE (UE, 2002) sobre el funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados para métodos de cribado y confirmación. La Decisión 2002/657/CE unifica en el ámbito europeo los requisitos para las medidas de control aplicables respecto a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. Es necesario garantizar la calidad y la comparabilidad de los resultados analíticos de los laboratorios autorizados para el control oficial de residuos y, para ello, deben aplicarse sistemas de garantía de calidad y, específicamente, métodos validados de acuerdo con procedimientos y criterios de funcionamiento comunes.

En este trabajo se muestra el procedimiento seguido en nuestro laboratorio para la validación de esta técnica, los criterios utilizados y los resultados obtenidos.

Diseño de la validación

En la validación se debe realizar un estudio de los parámetros que pueden influir en el resultado. El objetivo final es conocer el funcionamiento del método y fijar los criterios que debe cumplir con el fin de alcanzar resultados válidos con respecto al fin que se persigue con su aplicación.

En la validación de la técnica de cribado de residuos de antibióticos de las Cinco Placas se han seguido los siguientes pasos:

1. Definición del propósito del método. En este caso, el propósito del método es la detección del mayor número posible de residuos de antibióticos al nivel o por debajo de su límite máximo de residuos (LMR). Únicamente se trata de detectar antibióticos que cuenten con un LMR ya que la detección de los antibióticos cuyo uso está prohibido (por ejemplo, cloranfenicol o nitrofuranos) requiere una sensibilidad y especificidad mayor de la que presentan las técnicas microbiológicas.
2. Determinación de las características de método. De acuerdo con la Decisión 2002/657/CE (UE, 2002) los parámetros a estudiar en una técnica de cribado cualitativa son el límite de detección (CCß), la especificidad/selectividad y la robustez/aplicabilidad/estabilidad.
3. Establecimiento de los requisitos exigibles para cada uno de los parámetros:
   - Límite de detección. De acuerdo con la Decisión 2002/657/CE las técnicas de cribado cualitativas deben tener un porcentaje de falsos resultados negativos inferior al 5% (error ß) al nivel de interés. Esto implica que el límite de detección debería ser igual o inferior a los LMR establecidos para cada antibiótico, con un porcentaje de falsos resultados negativos inferior al 5%.
   - Especificidad/selectividad. Según la Decisión 2002/657/CE, la especificidad es la capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias. En este caso, la técnica tiene un rango de detección muy amplio por lo que el requisito exigible es que no existan interferencias sistemáticas debidas a la propia matriz y que, si existen, haya sistemas que eviten estas interferencias.
   - Aplicabilidad/robustez/estabilidad. Se requieren técnicas sencillas, económicas y de fácil aplicación, que tengan buena reproducibilidad. Asimismo, la técnica debe ser suficientemente robusta

de manera que no sea alterada por variaciones previsibles en el tiempo o temperatura de incubación, los analistas que la aplican, etc.

4. Aportación de evidencias que demuestren que el método cumple los requisitos exigibles:
   - Límite de detección. Hay varias fuentes posibles de información como la participación en ejercicios de intercomparación que hayan empleado muestras procedentes de animales tratados con antibióticos, la confirmación y cuantificación de muestras que hayan resultado positivas a la técnica de cribado y la realización de ensayos específicos. En este caso, se ha optado por este último sistema dado que el número de ejercicios de intercomparación que utilizan tejidos íntegros es muy limitado y las muestras positivas que han sido confirmadas son pocas y no cubren el espectro de antibióticos y concentraciones necesarias.
   - Especificidad/selectividad. Se debe estudiar si cada una de las matrices cuyo análisis puede realizarse con esta técnica causa inhibiciones sistemáticas del crecimiento bacteriano en las placas utilizadas. Esta técnica no es capaz de identificar los antibióticos dentro de una misma familia; únicamente pretende detectar la presencia de residuos de antibióticos. La especificidad de la técnica se incrementa eliminando las inhibiciones naturales que pudieran estar presentes de forma natural en los alimentos.
   - Aplicabilidad/robustez/estabilidad. Se debe realizar una valoración crítica de las características de la técnica, estudiando la posible variabilidad de los resultados en función de parámetros tales como el volumen de medio por placa, el tiempo de incubación, etc.
5. Evaluación y elaboración del informe. Una vez estudiados los distintos parámetros, debe llevarse a cabo una evaluación de los resultados de la validación realizada para concluir si el método analítico es válido o no para el uso previsto.

En este trabajo se evalúan los resultados obtenidos en la validación de la técnica de cribado de residuos de antibióticos de las Cinco Placas respecto a su límite de detección y especificidad.

Materiales y métodos

1. Patrones de antibióticos

Ácido Oxolínico Sigma O0877, Amoxicilina Sigma A8523, Ampicilina Sigma A9518, Apramicina Sigma A2024, Bacitracina B0125, Bencilpenicilina Sigma PENNA, Cefalexina Sigma C4895, Cefalonio Fluka 32904, Cefapirina Fluka 43989, Cefazolina Fluka 22127, Cefoperazona Sigma C4292, Cefquinoma Fluka 32472, Ceftiofur Vetranal 34001, Clortetraciclina Sigma C4881, Cloxacilina Sigma C9393, Colistina Sigma C4461, Danofloxacino Vetranal 33700, Dicloxacilina Sigma D9016, Difloxacino Vetranal 33984, Dihidroestreptomicina Sigma D7253, Doxiciclina Sigma D9891, Enrofloxacino Fluka 17849, Eritromicina Sigma E6376, Espectinomicina Sigma S9007, Espiramicina Vetranal 46745, Estreptomicina Sigma S6501, Fenoximetilpenicilina Vetranal 46616, Flumequina Sigma F7016, Fluorfenicol Sigma F1427, Gentamicina Sigma G3632, Kanamicina Sigma K4000, Lincomicina Sigma L6004, Marbofloxacino Vetranal 34039, Monensina Sigma M5273, Nafcilina Sigma N3269, Neomicina Sigma N1876, Novobiocina Sigma N1628, Oxacilina Sigma O1002, Oxitetraciclina Sigma O5875, Paromomicina Sigma P9297, Sarafloxacino Vetranal 33497, Sulfacloropiridazina Sigma S9882, Sulfadiazina Sigma S8626,

Sulfadiemtoxina Sigma S7007, Sulfadimidina Sigma S6256, Sulfametoxazol Sigma S7507, Sulfametoxipiridazina Sigma S7257, Sulfapiridina Sigma S6252, Sulfaquinoxalina Sigma S7382, Sulfatiazol Sigma S0127, Tetraciclina Sigma T3383, Tiamulina Vetranal 46959, Tianfenicol Sigma T0261, Tilmicosina Fluka 33864, Tilosina Sigma T6134, Trimetoprima Sigma T7883 y Valnemulina Fluka 32971.

2. Reactivos

Agua destilada estéril, NaOH 0,1 N a partir de hidróxido de sodio Merck 1.06498, ácido acético 5% a partir de ácido acético 96% Merck 1.00062 y metanol Merck 1.06007.

3. Preparación placas de ensayo

La técnica de cribado de residuos de antibióticos de las Cinco Placas se basa en la utilización de cinco placas de ensayo preparadas de acuerdo al procedimiento normalizado de trabajo del laboratorio del Centro Nacional de Alimentación (AESAN, 2012) (Tabla 1).

Tabla 1. Placas de ensayo de la técnica de cribado de las Cinco Placas: resumen de su preparación e incubación

Placa	pH 6	DST	pH 8	EC	KR
Microorganismo	*Bacillus subtilis* BGA Merck 1.10649	*Bacillus subtilis* BGA Merck 1.10649	*Bacillus subtilis* BGA Merck 1.10649	*Escherichia coli* CECT 4201	*Kocuria rhizophila* CECT 241
Medio de cultivo	Testagar pH 6 Merck 1.10663	*Diagnostic Sensitivity* Test Oxoid CM 261	Testagar pH 8 Merck 1.10664	Testagar pH 8 Merck 1.10664	Testagar pH 8 Merck 1.10664
ufc/ml medio	10^4	10^4	10^4	10^5	10^4
Otros µg/ml medio	NO	Trimetoprima 0,03 µg/ml	NO	NO	NO
ml de medio por placa de 90 o de 150 nm	90 mm-10 ml 150 mm-25ml	90 mm-10 ml 150 mm-25ml	90 mm-10 ml 150 mm-25ml	90 mm-10 ml 150 mm-25ml	90 mm-10 ml 150 mm-25ml
Disco control	Penicilina 0,01U/disco	Sulfadimidina 0,5 µg/disco	Estreptomicina 0,5 µg/disco	Ciprofloxacino 0,003 µg/disco	Estreptomicina 0,5 µg/disco
Resultado disco control (halo de inhibición)	> 6 mm anchura	> 6 mm anchura	> 6 mm anchura	> 6 mm anchura	>4 mm anchura
Temperatura de incubación	30 ºC	30 ºC	30 ºC	30 ºC	37 ºC
Tiempo de incubación	18-24 horas	18-24 horas	18-24 horas	18-24 horas	18-24 horas

4. Procedimiento de análisis

Una vez preparadas las placas se procede a la preparación de las muestras.

Para muestras de tejido se aplican dos discos de tejido sobre cada una de las placas de ensayo. Estos discos se obtienen con un sacabocados de 8 mm de diámetro interno y miden 2 mm de altura. En el caso de muestras fluidas como leche o huevo, éstas se colocan sobre la placa rellenando pocillos excavados de 8 mm de diámetro.

Las placas se incuban según el procedimiento de ensayo (véase la Tabla 1) y se mide la anchura del halo de inhibición del crecimiento obtenido para determinar si el resultado es positivo o no. El resultado es positivo si la anchura del halo de inhibición es igual o mayor de 2 mm. En el centro de las placas se sitúa un disco control que permite verificar en cada ensayo que la sensibilidad de la placa es adecuada.

5. Valoración de la especificidad

Aunque la técnica es necesariamente inespecífica, ya que únicamente trata de detectar inhibidores del crecimiento bacteriano, algunos tipos de muestras pueden contener inhibidores naturales y obligar a confirmar la presencia de residuos de antibióticos en muestras que, en realidad, no los contienen. Esto no supone un problema desde el punto de vista legal en España, ya que cualquier resultado positivo debe confirmarse por técnicas más específicas. Sin embargo, no es deseable, desde el punto de vista operativo, que se produzcan interferencias sistemáticas debidas a inhibidores naturales u otras sustancias presentes de forma habitual en las muestras.

Por ejemplo, se conoce que el riñón de cerdo contiene inhibidores naturales cuya actividad se puede evitar mediante la utilización de una membrana de celulosa interpuesta entre el tejido y el medio de cultivo (Calderón et al., 1992). El huevo también contiene inhibidores naturales y para reducir su actividad las muestras se tratan térmicamente a 70 ºC durante 20 minutos.

6. Estimación del límite de detección

Al existir límites máximos de residuos (LMR) legislados para los residuos de antibióticos (Reglamento (CE) Nº 470/2009) se debe estudiar la adecuación de los límites de detección de la técnica a estos límites máximos y, para ello, se realizan ensayos con muestras negativas adicionadas de una solución de antibiótico.

Para añadir el antibiótico a muestras fluidas como es el caso de la leche o el huevo, se adiciona directamente una solución del antibiótico en la muestra y se homogeneiza. Sin embargo, en las muestras de tejidos, en las que no se realizan homogeneizaciones o extracciones sino que se utiliza la muestra íntegra, se presenta un problema para añadir el antibiótico de una manera que sea representativa de la presencia del antibiótico en un tejido de un animal tratado.

A este respecto la Guía publicada por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para residuos de antibióticos (ANSES, 2010) ofrece dos posibilidades:

- El tejido se homogeneíza, se pesa, se añade el antibiótico y se mezcla. A continuación se congela. Las piezas de tejido con el antibiótico añadido y congeladas se aplican directamente en la placa.
- Se impregnan discos de papel con el antibiótico a ensayar, se sitúan en la placa sobre el medio de cultivo y, a continuación, se colocan sobre estos discos de papel los discos de tejido integro, sin homogeneizar.

En este trabajo se han estudiado las dos posibilidades propuestas por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea. Para ello, los pasos que se siguen para la elaboración de muestras adicionadas en cada caso son:

- Homogeneizar el tejido libre de antibiótico, añadir una dilución de antibiótico (0,1 ml en 5 g de muestra) y mezclarlo. Una vez mezclado, se introduce dentro de un cilindro de acero inoxidable, de 8 mm de diámetro interno, y se congela a -20 ºC. Después se procede al análisis tal y como se realiza con las muestras de tejido íntegro.
- Utilizar un disco de papel impregnado con la solución de antibiótico sobre el que se sitúa un disco de tejido íntegro. Para ello, en nuestro caso, se aplican 20 µl de una solución de antibiótico en un disco de papel para antibiograma de 6 mm de diámetro; el disco se coloca sobre la placa de ensayo y sobre él se aplica un disco de tejido integro libre de antibióticos de 2 mm de altura obtenido con un sacabocados de 8 mm de diámetro interno. El disco de tejido tiene un peso medio aproximado de 0,1 g y, por ello, se extrapola la cantidad de antibiótico presente al peso del disco de tejido (0,1 g) para establecer la concentración adicionada a la matriz (µg/kg).

Resultados

En este trabajo se han estimado los límites de detección de la técnica de cribado con Cinco Placas. En primer lugar, se utilizaron soluciones patrón para determinar en qué placa es más activo cada antibiótico y, por tanto, produce un mayor halo de inhibición. A continuación se determinó el limite de detección de un grupo de 23 antibióticos con cada uno de los dos sistemas de estimación (tejido homogeneizado con una solución de antibiótico o tejido intacto situado sobre un disco de papel con antibiótico). Finalmente, se realizaron 20 ensayos para determinar el límite de detección de 57 antibacterianos con muestras de músculo de distintas especies, riñón de bovino, leche, huevo y pescado. Los ensayos se realizaron combinando distintas condiciones que incluyeron factores tales como día del ensayo, analistas, muestras o lotes de preparación de medios de cultivo y de reactivos.

1. Determinación de la placa más sensible a cada antibiótico

Se contaba con un estudio previo de la sensibilidad de cada una de las cinco placas de las que consta la técnica a diferentes soluciones de antibióticos (Calderón, 2000).

Teniendo en cuenta los resultados de dicho estudio, la validación de cada antibiótico se llevó a cabo únicamente en la placa donde el halo de inhibición fue mayor a una concentración determinada de cada antibiótico.

De forma general y teniendo en cuenta que existen excepciones, las tetraciclinas se detectan en la placa con *B.subtilis* a pH 6, los betalactámicos, en la placa con *K.rhizophila* a pH 8 o en la de *B. subtilis* a pH 6, las cefalosporinas, en la placa con *K.rhizophila* a pH 8, los aminoglucósidos en la de *B. subtilis* a pH 8, los macrólidos, en la placa con *K. rhizophila* y las quinolonas en la placa con *E. coli* a pH 8.

2. Comparación de los sistemas de estimación del límite de detección

En las Tablas 2 y 3 se comparan los límites de detección obtenidos con ambos sistemas de estimación para un grupo de 23 antibióticos en músculo de porcino y riñón de bovino. Se observó que, en general,

el límite de detección estimado es mayor cuando se utiliza tejido homogeneizado con una solución de antibiótico frente al sistema que combina un cilindro de tejido intacto y un disco de papel con antibiótico.

Okerman et al. (2004) observaron que al homogeneizar muestras de músculo de pollo que contenían tetraciclinas (doxiciclina) se reducían los halos de inhibición respecto a los obtenidos con las mismas muestras sin homogeneizar. Esta reducción puede deberse a la unión del antibiótico al tejido homogeneizado, que conduce a una subestimación de los límites de detección de esta técnica, al menos para ciertos grupos de antibióticos. Los resultados de la confirmación por métodos fisicoquímicos de muestras positivas a tetraciclinas en el Centro Nacional de Alimentación indican que los límites de detección reales de la técnica de cribado con Cinco Placas para este grupo de antibióticos están más cerca de los obtenidos con la combinación de discos de antibiótico y discos de tejido íntegro que de los obtenidos con tejido homogeneizado con antibiótico.

En consecuencia, se eligió el sistema que combina discos de antibiótico y discos de tejido integro para realizar la estimación del límite de detección en el proceso de validación de la técnica.

Tabla 2. Comparación de los límites de detección (LD) obtenidos con músculo de porcino con los dos sistemas de estimación

Antibiótico	LMR (µg/kg)	LD disco papel + tejido (µg/kg)	LD tejido homogenizado (µg/kg)
Clortetraciclina	100	80	200
Amoxicilina	50	50	100
Ampicilina	50	50	80
Bencilpenicilina	50	24	80
Oxacilina	300	300	400
Danofloxacino	100	80	200
Difloxacino	400	240	300
Enrofloxacino	100	30	50
Marbofloxacino	150	30	60

Tabla 3. Comparación de los límites de detección obtenidos con riñón de bovino con los dos sistemas de estimación

Antibiótico	LMR (µg/kg)	LD disco papel + tejido (µg/kg)	LD tejido homogenizado (µg/kg)
Clortetraciclina	600	80	280
Doxiciclina	600	160	320
Oxitetraciclina	600	600	800
Tetraciclina	600	400	600
Bencilpenicilina	50	24	80
Nafcilina	300	100	120
Oxacilina	300	300	400
Cefalexina	1.000	1.000	1.600
Cefquinoma	200	160	180
Apramicina	20.000	10.000	20.000
Gentamicina	750	600	1.600
Kanamicina	2.500	2.000	8.000
Neomicina	5.000	4.000	10.000
Eritromicina	200	140	200
Lincomicina	1.500	800	800
Tilmicosina	1.000	240	480
Difloxacino	800	120	200
Enrofloxacino	200	10	16
Flumequina	1.500	600	1.400
Marbofloxacino	150	14	12

3. Determinación del límite de detección

El límite de detección se estableció en aquella concentración que causó halos de inhibición iguales o mayores a 2 mm de anchura. Sin embargo, en ocasiones, los halos de inhibición de algunos antibióticos no tienen un borde definido por lo que la anchura de la zona de inhibición utilizada para fijar el límite de detección puede ser superior a los 2 mm de anchura en función de la definición del borde del halo en cada caso. Así, la media de las anchuras de halo utilizadas para establecer el límite de detección fue de 5,09 mm considerando todos los antibióticos y todas las matrices y de 4,62 mm si se excluyen las sulfamidas, cuyos halos de inhibición son muy difusos.

Para fijar el límite de detección se tuvo en cuenta el criterio establecido por la Decisión 2002/657/CE de manera que el porcentaje de falsos resultados negativos debe ser inferior al 5% al nivel del límite de detección.

En las Tablas 4 a 19 se muestran los resultados de la estimación del límite de detección de la técnica de cribado con Cinco Placas en muestras de músculo de porcino, bovino, ovino y ave y de riñón de bovino, leche, huevo y pescado. Los resultados proceden de 20 muestras adicionadas para cada antibiótico en cada una de las matrices.

Tabla 4. Límites de detección de tetraciclinas en músculo

Tretraciclinas	LMR µg/kg porcino	Músculo porcino LD µg/kg[3]	LMR µg/kg bovino	Músculo bovino LD µg/kg	LMR µg/kg ovino	Músculo ovino LD µg/kg	LMR µg/kg ave	Músculo ave LD µg/kg
Placa de detección		**HI[1] (mm)±SD[2]**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Clortetraciclina pH 6	100	80 3,63±0,47	100	100 5,28±0,59	100	80 4,82±0,36	100	100 6,22±0,82
Doxiciclina pH 6	100	140 3,97±0,57	100	100 3,79±1,10	Sin límite	- -	100	100 3,39±0,51
Oxitetraciclina pH 6	100	500 3,81±0,46	100	400 3,60±0,47	100	400 4,59±0,92	100	400 3,69±0,56
Tetraciclina pH 6	100	300 3,45±0,50	100	300 4,86±1,72	100	400 3,79±0,45	100	300 3,36±0,70

[1]HI: halos de inhibición, anchura media (mm).

[2]SD: desviación típica.

[3]µg /kg (ppb).

Tabla 5. Límites de detección de betalactámicos en músculo

Betalactámicos	LMR µg/kg porcino	Músculo porcino LD µg/kg	LMR µg/kg bovino	Músculo bovino LD µg/kg	LMR µg/kg ovino	Músculo ovino LD µg/kg	LMR µg/kg ave	Músculo ave LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Amoxicilina KR	50	50 2,71±0,27	50	50 3,87±1,32	50	50 3,60±0,55	50	50 3,41±0,58
Ampicilina KR	50	50 2,90±0,22	50	50 4,07±0,55	50	50 4,76±0,40	50	50 3,89±0,51
Bencilpenicilina pH 6	50	24 3,79±0,45	50	20 4,49±0,72	50	40 5,76±0,82	50	50 6,14±0,98
Cloxacilina pH 6	300	800 3,83±0,66	300	600 4,29±0,45	300	600 4,18±0,59	300	1.400 4,71±0,86
Dicloxacilina pH 6	300	500 4,33±0,94	300	300 3,22±0,59	300	300 3,80±1,60	300	600 4,47±1,21
Fenoximetilpenicilina pH 6	25	30 3,76±0,73	Sin límite	- -	Sin límite	- -	25	25 3,70±0,56
Nafcilina KR	Sin límite	- -	300	100 5,15±0,66	300	100 5,47±0,38	Sin límite	- -
Oxacilina KR	300	300 3,60±0,50	300	300 3,82±0,46	300	300 4,76±0,54	300	300 3,68±0,74

Tabla 6. Límites de detección de cefalosporinas en músculo

Cefalosporinas	LMR µg/kg porcino	Músculo porcino LD µg/kg	LMR µg/kg bovino	Músulo bovino LD µg/kg	LMR µg/kg ovino	Músculo ovino LD µg/kg	LMR µg/kg ave	Músculo ave LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Cefalexina	Sin	-	200	400	Sin	-	Sin	-
KR	límite	-		3,06±0,46	límite	-	límite	-
Cefapirina	Sin	-	50	1.000	Sin	-	Sin	-
KR	límite	-		4,76±0,59	límite	-	límite	-
Cefquinoma	50	160	50	200	Sin	-	Sin	-
KR		4,90±0,78		3,28±0,48	límite	-	límite	-
Ceftiofur	1.000	2.000	1.000	1.000	1.000	1.000	Sin	-
KR		4,77±1,06		5,51±1,31		3,29±0,72	límite	-

Tabla 7. Límites de detección de aminoglucósidos en músculo

Aminoglucósidos	LMR µg/kg porcino	Músculo porcino LD µg/kg	LMR µg/kg bovino	Músulo bovino LD µg/kg	LMR µg/kg ovino	Músculo ovino LD µg/kg	LMR µg/kg ave	Músculo ave LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Apramicina	Sin	-	1.000	10.000	Sin	-	Sin	-
pH 8	límite	-		3,41±0,49	límite	-	límite	-
Dihidroestreptomicina	500	10.000	500	20.000	500	30.000	Sin	-
pH 8		4,13±0,37		5,57±0,47		7,07±0,86	límite	-
Espectinomicina	300	200.000	300	140.000	300	140.000	300	140.000
KR		4,81±1,13		5,55±0,56		5,28±0,80		4,92±0,96
Estreptomicina	500	10.000	500	10.000	500	10.000	Sin	-
pH 8		5,05±0,55		3,71±1,16		4,95±0,92	límite	-
Gentamicina	50	1.800	50	2.000	Sin	-	Sin	-
pH 8		4,28±1,18		4,22±0,42	límite	-	límite	-
Kanamicina	100	5.000	100	6.000	100	10.000	100	8.000
pH 8		4,43±0,44		4,30±0,52		4,74±0,36		4,61±0,55
Neomicina	500	10.000	500	10.000	500	10.000	500	10.000
pH 8		4,43±0,77		4,53±0,75		4,53±0,38		4,50±1,01
Paromomicina	500	8.000	500	10.000	500	10.000	500	6.000
pH 8		4,19±0,52		4,02±0,87		4,09±0,44		3,09±0,39

Tabla 8. Límites de detección de macrólidos en músculo

Macrólidos	LMR µg/kg porcino	Músculo porcino LD µg/kg	LMR µg/kg bovino	Músulo bovino LD µg/kg	LMR µg/kg ovino	Músculo ovino LD µg/kg	LMR µg/kg ave	Músculo ave LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Eritromicina KR	200	200 4,68±0,21	200	200 2,92±1,31	200	200 3,32±1,16	200	200 3,51±1,03
Espiramicina KR	250	7.000 7,05±1,85	200	2.000 5,81±1,23	Sin límite	- -	200	2.000 4,45±0,97
Lincomicina KR	100	2.000 5,31±1,30	100	2.000 5,89±1,56	100	2.000 4,79±0,64	100	2.000 5,12±0,74
Tilmicosina KR	50	1.800 5,81±1,29	50	1.000 6,10±2,81	50	1.000 6,23±0,97	75	1.000 8,80±1,54
Tilosina KR	100	1.400 3,83±0,87	100	800 4,41±1,19	100	800 4,47±0,72	100	800 5,19±0,73

Tabla 9. Límites de detección de quinolonas en músculo

Quinolonas	LMR µg/kg porcino	Músculo porcino LD µg/kg	LMR µg/kg bovino	Músulo bovino LD µg/kg	LMR µg/kg ovino	Músculo ovino LD µg/kg	LMR µg/kg ave	Músculo ave LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Ác. Oxolínico EC	100	300 4,55±1,25	100	2.000 6,74±0,52	100	1.000 5,43±0,53	100	1.000 4,78±0,68
Danofloxacino EC	100	80 5,79±1,14	200	100 5,98±0,87	200	160 6,01±0,54	200	160 6,18±0,80
Difloxacino EC	400	240 3,95±0,33	400	400 3,15±0,35	400	400 3,40±0,36	300	400 3,14±0,34
Enrofloxacino EC	100	30 4,34±0,28	100	60 4,74±1,40	100	80 5,91±0,48	100	60 4,23±0,62
Flumequina pH 6	200	600 4,61±0,84	200	400 4,16±0,84	200	800 5,96±0,64	400	400 3,86±0,75
Marbofloxacino EC	150	30 3,68±0,7	150	150 6,22±0,65	Sin límite	- -	Sin límite	- -

Tabla 10. Límites de detección del resto de antibióticos en músculo

Otros antibióticos	LMR µg/kg porcino	Músculo porcino LD µg/kg	LMR µg/kg bovino	Músulo bovino LD µg/kg	LMR µg/kg ovino	Músculo ovino LD µg/kg	LMR µg/kg ave	Músculo ave LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Colistina	150	160.000	150	100.000	150	100.000	150	100.000
EC		4,30±0,48		4,26±0,40		4,56±0,30		4,51±0,33
Fluorfenicol	300	7.000	200	8.000	200	8.000	100	8.000
pH 6		4,97±0,59		5,71±0,46		5,09±0,49		5,14±0,38
Fluorfenicol	300	7.000	200	8.000	200	8.000	100	8.000
pH 8		4,62±0,53		5,10±0,63		4,86±0,53		5,68±0,41
Monensina	Sin	-	2	14.000	Sin	-	Sin	-
pH 6	límite	-		3,15±0,31	límite	-	límite	-
Tiamulina	100	2.800	Sin	-	Sin	-	100	1.600
KR		5,54±1,27	límite	-	límite	-		5,14±0,96
Tianfenicol	50	30.000	50	20.000	50	20.000	50	20.000
KR		3,96±0,75		3,75±0,73		3,64±0,76		3,70±0,74
Trimetoprima	100	800	50	2.000	50	2.000	50	2.000
DST		7,88±0,80		10,45±1,44		9,60±0,54		11,21±1,35
Valnemulina	50	800	Sin	-	Sin	-	50	800
KR		7,00±0,42	límite	-	límite	-		4,96±1,10

Tabla 11. Límites de detección de sulfamidas en músculo

Sulfamidas	LMR µg/kg	Músculo porcino LD µg/kg	Músulo bovino LD µg/kg	Músculo ovino LD µg/kg	Músculo ave LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**	**HI (mm)±SD**	**HI (mm)±SD**	**HI (mm)±SD**
Sulfacloropiridazina	100	8.000	4.000	3.000	4.000
DST		8,80±1,36	8,49±0,99	6,43±1,07	8,26±1,41
Sulfadiazina	100	4.000	2.000	2.000	2.000
DST		10,02±1,47	9,28±1,33	9,98±0,66	9,41±0,90
Sulfadimetoxina	100	2.000	2.000	2.000	1.000
DST		6,62±0,95	10,95±0,81	10,45±1,19	8,17±0,96
Sulfadimidina	100	10.000	4.000	4.000	4.000
DST		9,23±1,73	8,14±3,00	5,53±0,56	8,47±2,27
Sulfametoxazol	100	2.000	1.000	1.000	1.000
DST		10,03±1,28	8,92±2,30	5,41±0,92	8,54±1,82
Sulfametoxipiridazina	100	6.000	2.000	2.000	2.000
DST		10,18±1,17	8,91±1,31	7,29±0,80	6,73±0,61
Sulfapiridina	100	8.000	4.000	4.000	4.000
DST		10,49±1,58	9,74±1,04	6,29±0,56	10,04±0,36
Sulfaquinoxalina	100	4.000	1.000	1.000	1.000
DST		11,05±1,28	9,31±0,64	7,98±0,71	10,23±1,03
Sulfatiazol	100	3.000	1.000	2.000	3.000
DST		8,89±2,24	5,00±0,41	8,76±1,44	9,53±1,88

Tabla 12. Límites de detección de tetraciclinas en riñón de bovino, leche, huevo y pescado

Tetraciclinas	LMR µg/kg riñón	Riñón bovino LD µg/kg	LMR µg/kg leche	Leche LD µg/kg	LMR µg/kg huevo	Huevo LD µg/kg	LMR µg/kg pescado	Pescado LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Clortetraciclina pH 6	600	80 2,86±0,52	100	100 3,44±1,03	200	1.500 5,14±0,56	100	100 4,61±0,99
Doxiciclina pH 6	600	160 3,70±0,49	Sin límite	- -	Sin límite	- -	Sin límite	- -
Oxitetraciclina pH 6	600	600 3,46±0,43	100	600 3,56±0,48	200	3.000 4,31±0,66	100	600 4,56±1,15
Tetraciclina pH 6	600	400 3,55±0,58	100	800 4,67±0,96	200	3.000 4,22±0,38	100	400 3,70±0,44

Tabla 13. Límites de detección de betalactámicos en riñón de bovino, leche, huevo y pescado

Betalactámicos	LMR µg/kg riñón	Riñón bovino LD µg/kg	LMR µg/kg leche	Leche LD µg/kg	LMR µg/kg huevo	Huevo LD µg/kg	LMR µg/kg pescado	Pescado LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Amoxicilina KR	50	80 3,87±0,46	4	100 6,11±0,51	Sin límite	- -	50	100 5,30±0,68
Ampicilina KR	50	80 4,99±1,18	4	100 7,86±1,05	Sin límite	- -	50	40 3,50±0,48
Bencilpenicilina pH 6	50	24 3,44±0,61	4	50 5,69±0,37	Sin límite	- -	50	24 3,69±0,78
Cloxacilina pH 6	300	1.200 4,15±1,00	30	1.000 3,92±0,83	Sin límite	- -	300	1.600 5,03±1,11
Dicloxacilina pH 6	300	600 4,83±0,54	30	500 4,62±1,65	Sin límite	- -	300	500 3,78±0,70
Nafcilina KR	300	100 3,90±0,51	30	100 4,62±0,65	Sin límite	- -	Sin límite	- -
Oxacilina KR	300	300 4,16±0,54	30	300 4,82±0,55	Sin límite	- -	300	300 4,81±0,52

Tabla 14. Límites de detección cefalosporinas en riñón de bovino, leche, huevo y pescado

Cefalosporinas	LMR µg/kg riñón	Riñón bovino LD µg/kg	LMR µg/kg leche	Leche LD µg/kg	LMR µg/kg huevo	Huevo LD µg/kg	LMR µg/kg pescado	Pescado LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Cefalexina	1.000	1.000	100	1.000	Sin	-	Sin	-
KR		4,60±0,99		6,26±1,72	límite	-	límite	-
Cefalonio	Sin	-	20	500	Sin	-	Sin	-
KR	límite	-		8,37±0,61	límite	-	límite	-
Cefapirina	100	-	60	60	Sin	-	Sin	-
KR		-		4,31±0,52	límite	-	límite	-
Cefazolina	Sin	-	50	4.000	Sin	-	Sin	-
KR	límite	-		5,45±1,17	límite	-	límite	-
Cefoperazona	Sin	-	50	1.000	Sin	-	Sin	-
KR	límite	-		5,33±0,99	límite	-	límite	-
Cefquinoma	200	160	20	200	Sin	-	Sin	-
KR		5,20±0,53		3,36±0,91	límite	-	límite	-
Ceftiofur	6.000	6.000	100	200	Sin	-	Sin	-
KR		6,23±1,43		5,50±1,73	límite	-	límite	-

Tabla 15. Límites de detección de aminoglucósidos en riñón de bovino, leche, huevo y pescado

Aminoglucósidos	LMR µg/kg riñón	Riñón bovino LD µg/kg	LMR µg/kg leche	Leche LD µg/kg	LMR µg/kg huevo	Huevo LD µg/kg	LMR µg/kg pescado	Pescado LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Apramicina	20.000	10.000	Sin	-	Sin	-	Sin	-
pH 8		3,64±0,39	límite	-	límite	-	límite	-
Dihidroestreptomicina	1.000	3.000	200	3.000	Sin	-	Sin	-
pH 8		3,31±0,41		4,00±0,69	límite	-	límite	-
Espectinomicina	5.000	120.000	200	30.000	Sin	-	300	200.000
KR		4,22±0,92		4,30±0,73	límite	-		6,72±1,20
Estreptomicina	1.000	3.000	200	5.000	Sin	-	Sin	-
pH 8		3,73±0,63		5,35±0,94	límite	-	límite	-
Gentamicina	750	600	100	200	Sin	-	Sin	-
pH 8		4,17±0,58		2,80±0,37	límite	-	límite	-
Kanamicina	2.500	2.000	150	2.000	Sin	-	Sin	-
pH 8		3,44±0,58		4,49±0,66	límite	-	límite	-
Neomicina	5.000	4.000	1.500	3.000	500	7.000	500	14.000
pH 8		4,33±0,76		4,21±0,37		3,91±0,57		4,29±0,52
Paromomicina	1.500	2.600	Sin	-	Sin	-	500	10.000
pH 8		4,05±0,56	límite	-	límite	-		3,94±0,62

Tabla 16. Límites de detección de macrólidos en riñón de bovino, leche, huevo y pescado

Macrólidos	LMR µg/kg riñón	Riñón bovino LD µg/kg	LMR µg/kg leche	Leche LD µg/kg	LMR µg/kg huevo	Huevo LD µg/kg	LMR µg/kg pescado	Pescado LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Eritromicina KR	200	140 4,08±0,93	40	40 5,25±0,94	150	100 4,55±0,81	200	320 4,59±1,29
Espiramicina KR	300	1.400 3,42±0,60	200	200 3,79±0,78	Sin límite	- -	Sin límite	- -
Lincomicina KR	1.500	800 4,43±0,49	150	800 5,00±0,81	50	500 3,66±0,42	100	1.400 5,44±0,81
Tilmicosina KR	1.000	240 3,74±1,04	50	50 5,38±1,01	Sin límite	- -	50	1.000 5,73±1,35
Tilosina KR	100	800 3,94±0,29	50	300 4,25±1,18	200	800 3,52±0,33	100	1.200 4,52±0,44

Tabla 17. Límites de detección de quinolonas en riñón de bovino, leche, huevo y pescado

Quinolonas	LMR µg/kg riñón	Riñón bovino LD µg/kg	LMR µg/kg leche	Leche LD µg/kg	LMR µg/kg huevo	Huevo LD µg/kg	LMR µg/kg pescado	Pescado LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Ác. Oxolínico EC	150	300 4,39±1,08	Sin límite	- -	Sin límite	- -	100	280 3,64±0,75
Danofloxacino EC	400	200 8,51±0,93	30	30 4,01±0,61	Sin límite	- -	100	80 5,80±0,58
Difloxacino EC	800	120 3,97±0,48	Sin límite	- -	Sin límite	- -	300	90 5,02±0,67
Enrofloxacino EC	200	10 5,03±0,97	100	80 7,27±0,85	Sin límite	- -	100	6 4,44±0,42
Flumequina pH 6	1.500	600 3,82±0,66	50	600 4,97±0,59	Sin límite	- -	600	660 4,41±0,39
Marbofloxacino EC	150	14 5,19±1,02	75	100 6,75±0,73	Sin límite	- -	Sin límite	- -
Sarafloxacino EC	Sin límite	- -	Sin límite	- -	Sin límite	- -	30	200 4,69±0,60

Tabla 18. Límites de detección del resto antibióticos en riñón de bovino, leche, huevo y pescado

Otros antibióticos	LMR µg/kg riñón	Riñón bovino LD µg/kg	LMR µg/kg leche	Leche LD µg/kg	LMR µg/kg huevo	Huevo LD µg/kg	LMR µg/kg pescado	Pescado LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Bacitracina	Sin	-	100	2.000	Sin	-	Sin	-
KR	límite	-		4,56±1,00	límite	-	límite	-
Colistina	200	60.000	50	10.000	300	50.000	150	60.000
EC		5,14±0,89		2,94±0,61		3,70±0,83		4,27±0,56
Fluorfenicol	300	6.000	Sin	-	Sin	-	1.000	7.000
pH 6		4,10±1,08	límite	-	límite	-		4,94±0,62
Fluorfenicol	300	6.000	Sin	-	Sin	-	1.000	7.000
pH 8		3,92±0,97	límite	-	límite	-		4,41±0,49
Novobiocina	Sin	-	50	10.000	Sin	-	Sin	-
KR	límite	-		4,85±0,57	límite	-	límite	-
Tiamulina	Sin	-	Sin	-	1.000	3.500	Sin	-
KR	límite	-	límite	-		4,53±0,51	límite	-
Tianfenicol	50	30.000	50	40.000	Sin	-	50	30.000
KR		4,45±0,63		7,03±1,52	límite	-		3,94±0,41
Trimetoprima	50	600	50	500	Sin	-	50	400
DST		9,08±1,01		6,43±0,63	límite	-		4,97±1,29

Tabla 19. Límites de detección de sulfamidas en riñón de bovino, leche, huevo y pescado

Sulfamidas	LMR µg/kg riñón	Riñón bovino LD µg/kg	LMR µg/kg leche	Leche LD µg/kg	LMR µg/kg huevo	Huevo LD µg/kg	LMR µg/kg pescado	Pescado LD µg/kg
Placa de detección		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**		**HI (mm)±SD**
Sulfacloropiridazina	100	10.000	100	5.000	Sin	-	100	4.000
DST		10,17±0,80		9,75±0,98	límite	-		7,85±1,77
Sulfadiazina	100	4.000	100	500	Sin	-	100	2.000
DST		10,26±1,03		5,78±2,02	límite	-		7,92±1,53
Sulfadimetoxina	100	4.000	100	500	Sin	-	100	800
DST		9,88±1,33		6,34±1,68	límite	-		5,74±2,41
Sulfadimidina	100	10.000	100	5.000	Sin	-	100	4.000
DST		10,07±1,27		9,38±2,17	límite	-		6,35±1,16
Sulfametoxazol	100	2.000	100	500	Sin	-	100	800
DST		8,92±1,13		6,35±1,38	límite	-		6,93±1,54
Sulfametoxipiridazina	100	4.000	100	2.000	Sin	-	100	2.000
DST		8,99±1,43		9,51±0,68	límite	-		7,20±1,41
Sulfapiridina	100	8.000	100	2.000	Sin	-	100	4.000
DST		10,18±1,26		8,32±0,80	límite	-		7,39±1,75
Sulfaquinoxalina	100	4.000	100	500	Sin	-	100	800
DST		10,52±0,79		4,87±1,22	límite	-		6,24±1,89
Sulfatiazol	100	2.000	100	800	Sin	-	100	1.000
DST		7,97±1,75		6,13±1,45	límite	-		5,67±1,13

Tabla 20. Comparación del límite de detección (LD) frente al límite máximo de residuos (LMR) de los antibióticos ensayados (número de antibióticos)

	LD ≤ LMR	1 LMR< LD ≤ 2 LMR	LD > 2 LMR	Total antibióticos ensayados
Músculo de porcino	10	4	33	47
Músculo de bovino	14	3	32	49
Músculo de ovino	12	1	27	40
Músculo de ave	11	2	28	41
Riñón de bovino	22	5	20	47
Leche	7	4	35	46
Huevo	1	0	8	9
Pescado	7	4	25	36

Tabla 21. Antibióticos cuyo límite de detección es inferior o igual al límite máximo de residuos

Músculo de porcino	Músculo de bovino	Músculo de ovino	Músculo de ave	Riñón de bovino	Leche	Huevo	Pescado
Clortetraciclina	Clortetraciclina	Clortetraciclina	Clortetraciclina	Clortetraciclina	Clortetraciclina	Eritromicina	Clortetraciclina
Amoxicilina	Doxiciclina	Amoxicilina	Doxiciclina	Doxiciclina	Cefapirina		Ampicilina
Ampicilina	Amoxicilina	Ampicilina	Amoxicilina	Oxitetraciclina	Eritromicina		Bencilpenicilina
Bencilpenicilina	Ampicilina	Bencilpenicilina	Ampicilina	Tetraciclina	Espiramicina		Oxacilina
Oxacilina	Bencilpenicilina	Dicloxacilina	Bencilpenicilina	Bencilpenicilina	Tilmicosina		Danofloxacino
Eritromicina	Dicloxacilina	Nafcilina	Fenoximetil-	Nafcilina	Danofloxacino		Difloxacino
Danofloxacino	Nafcilina	Oxacilina	penicilina	Oxacilina	Enrofloxacino		Enrofloxacino
Difloxacino	Oxacilina	Ceftiofur	Oxacilina	Cefalexina			
Enrofloxacino	Ceftiofur	Eritromicina	Eritromicina	Cefquinoma			
Marbofloxacino	Eritromicina	Danofloxacino	Danofloxacino	Ceftiofur			
	Danofloxacino	Difloxacino	Enrofloxacino	Apramicina			
	Difloxacino	Enrofloxacino	Flumequina	Gentamicina			
	Enrofloxacino			Kanamicina			
	Marbofloxacino			Neomicina			
				Eritromicina			
				Lincomicina			
				Tilmicosina			
				Danofloxacino			
				Difloxacino			
				Enrofloxacino			
				Flumequina			
				Marbofloxacino			

El riñón de bovino es la matriz en la que más antibióticos se detectan al nivel o por debajo de su límite máximo y la única en la que se detectan antibióticos aminoglucósidos. La clortetraciclina y el danofloxacino se detectan por debajo de su límite máximo de residuos en todas las matrices ensayadas excepto en huevo. Por su parte, la eritromicina se detecta al nivel del límite máximo de residuos en todas las matrices excepto en el pescado.

Dentro de las tetraciclinas, la clortetraciclina y la doxiciclina se detectan a niveles inferiores a los de la tetraciclina y la oxitetraciclina. Entre los betalactámicos, la amoxicilina, ampicilina y bencilpenicilina presentan límites de detección menores que los del resto.

La detección de betalactámicos con esta técnica en leche no es aceptable dada la frecuencia de estos residuos en esta matriz, para su control deben utilizarse otros métodos de detección como los de Inhibición del crecimiento del *Bacillus stearothermophilus*, que son más sensibles a este grupo de antibióticos. Esta técnica de cribado con cinco placas sólo tendría utilidad en esta matriz para detectar aquellos antibióticos que, como las quinolonas, no son bien detectados por *B. stearothermophilus*.

Las quinolonas son el grupo que mejor se detecta con esta técnica en todas las matrices que presentan LMR. Esta detección se produce incluso a niveles muy por debajo del LMR por lo que es importante realizar la identificación y cuantificación posterior por técnicas de confirmación más específicas.

La detección de aminoglucósidos y macrólidos es claramente mejor en riñón que en músculo y las sulfamidas no se detectan en ningún caso a niveles aceptables. Este último grupo se analiza mediante otras técnicas en el Plan Nacional de Investigación de Residuos por lo que sólo cabe esperar su detección mediante esta técnica en casos de contaminación muy elevada o de matrices que, como el pienso, puedan contener la sustancia activa con fines terapéuticos.

Conclusiones

Los resultados obtenidos suponen sólo una estimación respecto a los límites de detección de esta técnica de cribado de residuos de antibióticos con Cinco Placas en tejidos dado que sólo la utilización de muestras de tejido íntegro permitiría una estimación precisa de sus límites de detección. Además, la estimación se ha realizado con un margen de seguridad elevado puesto que sólo se han considerado halos de inhibición perfectamente visibles, superando ampliamente el umbral de 2 mm de anchura del halo de inhibición fijado en la técnica para concluir un resultado positivo.

La validación de la técnica de cribado de residuos de antibióticos realizada conforme a las directrices de la Decisión 2002/657/CE ha demostrado que, aunque para algunos residuos de antibióticos la detección se realiza a niveles superiores, esta técnica permite detectar un cierto número de antibióticos en diversos alimentos al nivel o por debajo de su límite máximo de residuos. Para estos antibióticos, una vez analizadas 20 muestras de músculo de porcino, bovino, ovino y ave, riñón de bovino, leche, huevo y pescado, en todos los casos las muestras resultan positivas al nivel del límite máximo de residuos, causando un halo mayor de 2 mm de anchura. Por tanto se cumple con el criterio fijado en la Decisión 2002/657/CE, ya que el porcentaje de falsos negativos no supera el 5% a esta concentración y se concluye que la técnica es valida para el uso previsto.

Para aquellos residuos de antibióticos cuyos límites de detección sean insuficientes y una evaluación

del riesgo establezca que son de interés desde el punto de vista de su control, se debe estudiar una estrategia analítica alternativa.

Esta técnica es aplicable para la detección de un amplio espectro de residuos de antibióticos en distintas matrices de origen animal con buena especificidad al nivel de interés, una alta aplicabilidad, ya que es una técnica sencilla y de bajo coste y con un límite de detección a nivel del límite máximo de residuos o menor para distintos residuos de antibióticos.

Agradecimientos

Agradecemos al Departament de Salut de la Generalitat de Cataluña por facilitar parte de las muestras utilizadas en este estudio.

Referencias

AESAN (2012). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (Centro Nacional de Alimentación). Procedimiento Normalizado de Trabajo para la técnica de cribado de residuos de antibacterianos con Cinco Placas, de fecha de edición 12 de enero de 2012.

ANSES (2010). French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety. Guidelines for the Validation of Screening Methods for Residues of Veterinary Medicines (Initial Validation and Transfer). Community Reference Laboratories Residues (CRLs). Disponible en: http://crl.fougeres.anses.fr/publicdoc/Guideline_Validation_Screening_en.pdf [acceso: 12-11-2012].

Bogaerts, R. y Wolf, F. (1980). A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtschaft*, 60, pp: 672-674.

Calderón, V., Berenguer, J.A., González, J. y Díez, P. (1992). Análisis de residuos de antibióticos y sulfamidas en productos cárnicos mediante la utilización de una membrana de celulosa aplicada a la técnica de cribado de las cuatro placas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CSIC*, 32 (3), pp: 331-339.

Calderón, V. (2000). Control sanitario de residuos de antibióticos en carnes por métodos microbiológicos. Directores: Joaquín Berenguer y Mª del Carmen de la Rosa. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Centro Nacional de Alimentación. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo.

Currie, D., Lynas, L., Kennedy, D.G. y McCaughey, W.J. (1998). Evaluation of a modified EC Four Plate Method to detect antimicrobial drugs. *Food Additives and Contaminants*, 15 (6), pp: 651-660.

Ellerbroek, L. (1991). Zum mikrobiologischen Nachweis der Chinoloncarbonsaurederivate Enrofloxacin, Ciprofloxacin und Flumequin. *Fleischwirtschaft*, 71, pp: 187-189.

Gaudin, V., Hedeu, C., Rault, A. y Verdon, E. (2010). Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to European Decision 2002/657/EC. *Food Additives and Contaminants*, 27 (7), pp: 935-952.

Okerman, L., Croubels, S., Cherlet, M., de Wasch, K., de Backer, P. y Van Hoof, J. (2004). Evaluation and establishing the performance of different screening test for tetracycline residues in animal tissues. *Food Additives and Contaminants*, 21 (2), pp: 145-153.

Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. BOE 188 de 7 de agosto de 1998, pp: 26910-26927.

UE (1996). Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de Abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. DO L 125 de 23 de mayo de 1996, pp: 1-29.

UE (2002). Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados. DO L 221 de 17 de agosto de 2002, pp: 8-36.

UE (2009). Reglamento (CE) Nº 470/2009 del Paramento Europeo y del Consejo, de 6 de Mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites máximos de residuos de sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal. DO L 152 de 16 de junio de 2009, pp: 11-22.

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, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD
agencia española de seguridad alimentaria y nutrición