

Revista del
Comité
Científico de la aesa

agencia española de seguridad alimentaria
agencia española de seguridad alimentaria
agencia española de seguridad alimentaria
agencia española de seguridad alimentaria



Nº1

Revista del
Comité
Científico de la aesa

Madrid, 2005

Miembros del Comité Científico de la AESA

Andreu Palou Oliver

Presidente

Juan José Badiola

Vicepresidente

Arturo Anadón Navarro

Margarita Arboix Arzo

Albert Bosch Navarro

Juan Francisco Cacho Palomar

Francesc Centrich Escarpenter

Jose Luis García López

M^a Luisa García López

Manuela Juárez Iglesias

Manuel Martín Esteban

Juan Antonio Ordóñez Pereda

Andrés Otero Carballeira

Fernando Rodríguez Artalejo

Elías Rodríguez Ferri

Jose Manuel Sánchez Vizcaíno Rodríguez

Vicente Sanchis Almenar

Gregorio Varela Moreiras

Gonzalo Zurera Cosano

Revista del Comité Científico de AESA

Consejo Editorial

Presidenta de Honor

Elena Salgado

Editores Jefe

María Neira

José Ignacio Arranz Recio

Secretarios

Maria Luz Carretero Baeza

Jesús Campos Amado

Consejo Editorial Científico

Andreu Palou Oliver

Presidente del Comité Científico

Juan José Badiola

Vicepresidente del Comité Científico

Arturo Anadón Navarro

Margarita Arboix Arzo

Juan José Badiola

Albert Bosch Navarro

Juan Francisco Cacho Palomar

Francesc Centrich Escarpenter

Jose Luis García López

M^a Luisa García López

Manuela Juárez Iglesias

Manuel Martín Esteban

Juan Antonio Ordóñez Pereda

Andrés Otero Carballeira

Fernando Rodríguez Artalejo

Elías Rodríguez Ferri

Jose Manuel Sánchez Vizcaíno Rodríguez

Vicente Sanchis Almenar

Gregorio Varela Moreiras

Gonzalo Zurera Cosano

Responsable de Comunicación AESA

Héctor Alonso

AESA: Alcalá, 56. 28071. Madrid

e-mail: comunicacionAesa@msc.es

Diseño y maquetación

Montserrat Gómez

Imprime

Rumagraf

NIPO: 355-05-002-9

D.L.: M-27353-2005

Índice

| | |
|--|-----------|
| Sapere aude! | 7 |
| Ciencia, transparencia y previsión | 9 |
| Comité Científico y grupos de expertos | 11 |
| La alergia por anisakis y medidas de prevención | 19 |
| La aplicación de altas presiones en la carne | 36 |

El punto de partida de esta Revista es el "*sapere aude!*" del primer y último gran ilustrado alemán Immanuel Kant, el rebelde "atrévete a saber", es una máxima que aboga por la cultura frente al obscurantismo.

El pasado año se cumplieron 200 años de la muerte de Kant pero todavía su famosa frase sigue estando de plena vigencia, entendiéndola como la necesidad que tiene el hombre de saber para comprender o actuar, ¡incluso en temas de seguridad alimentaria!

"Atrévete a saber", es atreverse a usar el propio juicio. Pero no menos provechosa y liberadora es la advertencia de Hegel, que nos mostró como condición de posibilidad del pensar, la osadía de equivocarse, porque quizá "*el temor a errar sea ya el error mismo*".

"Atrévete a saber", o tengamos el valor de saber acerca de lo que nos rodea, nos puede servir de premisa para conocer más y mejor el complejo equilibrio de actuaciones que conforman la alimentación humana y más concretamente la seguridad alimentaria.

Las crisis alimentarias acaecidas en Europa en los últimos años nos demostraron que no sabíamos tanto sobre una serie de riesgos potenciales o presentes en los alimentos. Cuanto más avanzábamos en las crisis, más conscientes éramos de nuestras limitaciones y de la falta de respuestas basadas en la ciencia.

Esa falta constatada de conocimiento sobre la etiología de algunos peligros alimentarios emergentes fue en sí misma, una de las lecciones aprendidas en esas crisis alimentarias. Una vez más el viejo lema de la ilustración fue determinante y *sapere aude!* invadió las mentes de muchos expertos y científicos europeos en temas de alimentación.

De esa forma, se crearon Agencias o unidades especializadas exclusivamente en seguridad alimentaria, empezando por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y continuando por agencias nacionales, con una especial incidencia en el conocimiento científico alimentario, a través de la evaluación de riesgos alimentarios.

En España, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, se creó mediante la Ley 11/2001, de 5 de julio.

Uno de los órganos de la Agencia es el Comité Científico; entre sus funciones destaca la de proporcionar a la Agencia dictámenes científicos en materia de seguridad alimentaria.

Esos dictámenes son uno de los cimientos en los que se debe basar la gestión de riesgos alimentarios para poder conseguir una mejor seguridad en los alimentos que ingieren los consumidores españoles.

La idea de integrar conocimiento y sabiduría (dictámenes de evaluación de riesgos) en la realidad cotidiana (gestión de riesgos alimentarios) debe ser perenne pero también abierta a integrar diferentes interpretaciones, todas ellas igual de útiles en esta tarea común que es la seguridad alimentaria.

Con este Boletín del Comité Científico, del que se publica el primer número, se quiere divulgar a todos los involucrados, los dictámenes elaborados por los eminentes científicos que forman parte de este Comité, a los cuales de nuevo manifiesto el agradecimiento de la AESA y el mío propio por su entusiasta y desinteresada colaboración en los trabajos desarrollados, animándoles a proseguir con la importante misión de elaboración y divulgación de ciencia alimentaria, siempre bajo el lema *sapere aude!*

Confiamos en vosotros. Confiamos en nosotros.

María Purificación Neira González

PRESIDENTA DE LA AESA

La evolución de las políticas y hábitos en temas de seguridad alimentaria en España es el reflejo de la demanda de salud, bienestar y calidad de vida de los ciudadanos, en cuya percepción de los riesgos influye, fundamentalmente, la confianza que le merecen sus Instituciones.

Hoy en nuestro país ya se es consciente de que la toma de decisiones en el ámbito de la seguridad y calidad de los alimentos - y en muchos otros temas de salud en general o del medio ambiente - requiere contar con un asesoramiento científico estructurado e independiente, una práctica experimentada en el análisis científico, capaz de aportar objetivamente, y de manera transparente, toda la información relevante para que las decisiones que se tomen puedan ser coherentes y proporcionales a cada problema.

Se trata de tener un sistema basado en toda la ciencia disponible, que permita concertar la máxima reducción de los riesgos para la salud humana con un robusto marco de referencia que oriente las iniciativas (individuales, de las industrias, de los consumidores, de los legisladores) que permiten el progreso y la mejora de la alimentación y la seguridad alimentaria en todas sus acepciones. Sabemos que para tener éxito debemos guiarnos por los mejores conocimientos científicos, asegurar toda independencia de los intereses políticos e industriales, aceptar el control público riguroso, alcanzar un nivel de reconocimiento como referencia científica, y colaborar estrechamente con los organismos científicos internacionales.

A menudo el gestor desearía que la evaluación científica le proporcionara respuesta a todas sus incertidumbres, pero es importante reconocer que la evaluación científica del riesgo no proporciona toda la información en la que debe basarse una determinada decisión en seguridad alimentaria. El buen análisis científico no es el que apoya o refuta rígidamente cualquiera de las posiciones posibles frente una cuestión, sino el que permite determinar los riesgos o se aproxima a su determinación al ser capaz de substanciar científicamente los elementos que intervienen, reconociendo las incertidumbres y los márgenes de apreciación y de posible error.

La administración responsable de la gestión del riesgo (la toma de decisiones políticas de seguridad alimentaria) ha de ponderar las alternativas posibles que haya sacado a la luz la evaluación científica de riesgos, pero su decisión debe tener en cuenta también otros factores: sociológicos, éticos, económicos, culturales, tradicionales, medioambientales, etc., así como la valoración de la capacidad técnica disponible que pueda permitir la implantación de las medidas a adoptar.

La comunicación o información del riesgo, es decir, la transparencia que debe impregnar todas las etapas de cualquier proceso de toma de decisiones, es uno de los elementos esenciales del análisis de riesgos para que el sistema goce de la confianza de los ciudadanos, garantizando un acceso igualitario a la influencia de los diferentes intereses en el poder de decisión. Junto al diálogo continuo de la AESA con todos los interlocutores, esta Revista del Comité Científico de la AESA contribuirá a la transparencia mediante la difusión del detalle de todos nuestros informes y dictámenes. Será un complemento de fondo a la inmediatez de la difusión de los temas a través de Internet, y de los resúmenes y noticias de urgencia, entre otras formas de comunicación de la AESA.

El papel de la ciencia en el proceso regulador es claro: evaluar lo que está pasando, lo que puede pasar, cuáles son los mecanismos y las probabilidades de tales acontecimientos, y cuales las posibles alternativas para su control. No pretende cambiar el juicio intuitivo de los ciudadanos sobre qué riesgos son aceptables y cuales no, sino más bien asegurar que estos juicios se beneficien de un proceso de análisis científico de los problemas, participativo y bien estructurado. Algo aparentemente tan simple, nos indica también que, en temas de seguridad alimentaria, no nos podemos conformar sólo con afrontar problemas candentes o concretos más o menos inmediatos, sino que la tarea debe incluir la previsión de nuevos retos y problemas en una perspectiva a medio y largo plazo, incluyendo la consideración de los cambios sociales previsibles y, en particular, las consecuencias sobre el ámbito alimentario derivadas de los nuevos avances en el conocimiento científico y tecnológico.

Andreu Palou Oliver

PRESIDENTE DEL COMITÉ CIENTÍFICO DE LA AESA

Organización, funcionamiento y procedimiento de trabajo

Ámbito de aplicación

La Ley 11/2001, de 5 de julio, por la que se crea la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (en adelante AESA), en su artículo 4.4.a) crea el Comité Científico, con objeto de proporcionar a dicha Agencia el asesoramiento científico necesario para la realización de sus actividades.

El Real Decreto 709/2002, de 19 de julio, por el que se aprueba el estatuto de la AESA, en su Sección 3ª: Órganos de evaluación de riesgos establece la composición, funcionamiento, nombramiento y declaración de incompatibilidad de los miembros de dicho Comité Científico, estableciendo, así mismo, que bajo su dependencia se constituirán grupos de expertos de evaluación de riesgos alimentarios.

Funciones del Comité Científico

De acuerdo con lo dispuesto en el artículo 4.4. de la Ley 11/2001 y del artículo 22.1 del Real Decreto 709/2002, de 19 de julio, las funciones del Comité Científico son las siguientes:

1. Proporcionar a la AESA dictámenes científicos en materia de seguridad alimentaria.
2. Definir el ámbito de los trabajos de investigación necesarios para el desarrollo de las funciones de la AESA.
3. Coordinar los trabajos de grupos de expertos que realicen actividades de evaluación de riesgos en el marco de las actuaciones de la AESA.

Composición del Comité Científico

a) Teniendo en cuenta la diversidad de disciplinas que requiere el análisis de los riesgos relacionados con la seguridad alimentaria, el Comité Científico, de acuerdo con lo establecido en el artículo 22.2 del Real Decreto 709/2002, de 19 de julio, estará integrado por veinte miembros de reconocida competencia científica en los ámbitos relacionados con la seguridad alimentaria.

Independencia y confidencialidad

La pertenencia al Comité Científico será incompatible con cualquier clase de intereses, directos o indirectos, con la industria alimentaria o cualquier institución pública o privada relacionada con la alimentación, que puedan afectar a la independencia de los dictámenes.

Los miembros del Comité Científico, así como quienes participen en sus reuniones o grupos de trabajo, guardarán secreto de la deliberaciones, así como de todos los datos e informaciones de las que tuviesen conocimiento en el ejercicio de sus funciones, estando obligados al sigilo profesional durante el proceso de elaboración de informes y hasta tanto éstos se consideren finalizados y se hagan públicos.

El Comité Científico y sus miembros canalizarán toda relación institucional derivada de su pertenencia a la Agencia a través del Director Ejecutivo y del Consejo de Dirección. No llevarán a cabo actividades de comunicación de riesgos, así como cualquier tipo de manifestaciones o declaraciones en relación con su actividad de evaluación, sin la expresa autorización del Consejo de Dirección.

A estos efectos, suscribirán los documentos incluidos en el Anexo I, en los que se hace declaración pública de intereses relacionados con la industria alimentaria y se comprometen a respetar la confidencialidad sobre las deliberaciones así como de todos los datos, documentos e informaciones de las que tuviesen conocimiento en el ejercicio de sus funciones como miembros del Comité Científico.

Funcionamiento del Comité Científico y de los grupos expertos

Nombramiento de miembros y designación de Presidente y Vicepresidente (artículo 23 del estatuto de la AESA)

Los miembros del Comité Científico serán seleccionados y nombrados por el Consejo de Dirección de la AESA, a propuesta del Presidente de la misma, por un periodo de dos años renovable.

Por los miembros del Comité Científico y de entre los mismos, se nombrará un Presidente y un Vicepresidente.

Creación y funcionamiento de los Grupos de Expertos

Tras la aplicación del procedimiento previo de selección efectuado por la AESA (Anexo II), a las solicitudes de informes o dictámenes científicos que se le presenten, y puesta de manifiesto la necesidad de creación de un Grupo de Expertos de evaluación del riesgo en cuestión, para la elaboración del pertinente informe o dictamen, la Subdirección General de Coordinación Científica propondrá al Director Ejecutivo de la AESA la creación del mismo.

El Director Ejecutivo, asistido por la Subdirección General de Coordinación Científica, en consulta con el Presidente y el Vicepresidente del Comité Científico elegirá en cada caso, los componentes del Grupo de Expertos, que podrán ser miembros del Comité, expertos externos, en las áreas mencionadas en el apartado de composición del Comité Científico o en otras disciplinas igualmente conexas con la seguridad alimentaria, elevando la propuesta de creación del Grupo de Expertos y su composición al Consejo de Dirección para su aprobación.

En el acuerdo del Consejo de Dirección de creación de cada uno de los grupos de expertos, que con carácter general no serán permanentes, se establecerá además de su composición, los objetivos que se pretenden, así como el plazo o calendario previsto para la ejecución del mandato encomendado.

Tras la aprobación por el Consejo de Dirección se constituirá el Grupo de Expertos y se designará por y entre sus miembros un coordinador del mismo.

El coordinador del Grupo de Expertos deberá planificar, distribuir el trabajo encomendado por el Consejo de Dirección y, tras consultar con los miembros del mismo, fijará los plazos de las tareas necesarias para su realización, de acuerdo con el calendario establecido y redactará el proyecto de informe con las aportaciones de todos los expertos. Asimismo, decidirá cuando dicho proyecto de informe ha alcanzado el estado apropiado para su presentación y su adopción, si procede, por el Comité Científico. Para su presentación el informe o dictamen deberá haber sido aprobado por la mayoría simple de los componentes del Grupo de Expertos.

El informe se presentará en el formato indicado en el Anexo III y estará orientado a la ulterior gestión de riesgos alimentarios. Se hará constar, en caso de controversia, los votos particulares motivados.

El Comité Científico refrendará, si procede, el informe científico de cada Grupo de Expertos, expresándose formalmente mediante "Informes del Comité Científico de la AESA", que se harán públicos, de acuerdo con lo establecido en el artículo 35 del Estatuto.

Los Grupos de Expertos informarán del resultado de su actividad, al Presidente del Comité Científico y éste al Consejo de Dirección a través del Director Ejecutivo.

El presidente del Comité Científico y la Subdirección General de Coordinación Científica coordinarán los trabajos de los Grupos de Expertos.

Secretaría Técnica y Secretaría Administrativa

La Secretaría Técnica del Comité Científico, que es asumida por la Subdirección General de Coordinación Científica, tendrá las siguientes funciones:

- Preparar de acuerdo con el Presidente la convocatoria y orden del día de las reuniones plenarias.
- Preparar de acuerdo con los responsables de los Grupos de Expertos la documentación correspondiente a cada reunión plenaria.
- Asegurar la adecuada coordinación del trabajo realizado por el Comité y los Grupos de Expertos.
- Recibir las comunicaciones, informes y observaciones de las evaluaciones de riesgos por escrito de los responsables de los Grupos de Expertos.
- Asistir a las sesiones plenarias con voz y sin voto y preparar las actas de las mismas.
- Controlar el cumplimiento de los plazos acordados para la ejecución del trabajo encomendado.
- Requerir al solicitante la documentación complementaria a demanda del Comité Científico o de los Grupos de Expertos.
- Gestionar el procedimiento previo de selección de solicitudes de informe de evaluación de riesgos alimentarios, así como los correspondientes apoyos técnico-científicos del procedimiento normalizado de actuación del Comité Científico y Grupos de Expertos.

La Secretaría Administrativa corresponderá al Servicio de Apoyo a Consejos y Comités de la Secretaría General de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y tendrá las siguientes funciones:

- Preparar y enviar, de acuerdo con las instrucciones de la Secretaría Técnica la convocatoria, el orden del día y la documentación necesarios para las reuniones correspondientes del Comité Científico y de los Grupos de Expertos.

- Asistir a las sesiones plenarias del Comité Científico, para dar el apoyo administrativo que resulte necesario.

Organización de reuniones. Convocatorias y Sesiones.

El Comité Científico, así como los Grupos de Expertos dependientes del mismo, se reunirán, en general, en la sede de la AESA.

Las fechas de las reuniones plenarias del Comité Científico se establecerán anualmente, en la primera reunión del año y tendrán periodicidad trimestral.

No obstante, la Secretaría podrá convocar reuniones extraordinarias a instancias del Presidente del Comité o del Director Ejecutivo de la AESA.

Cuando un miembro del Comité no pueda asistir a las reuniones deberá informar a la secretaría por adelantado de su no comparecencia en la reunión.

Para la adopción de acuerdos por el Comité Científico será necesaria la presencia de la mitad más uno de sus miembros.

A las reuniones plenarias del Comité Científico podrán asistir los expertos externos que hayan participado en la elaboración de los dictámenes científicos incluidos para su aprobación en el Orden del día.

Remuneraciones y dietas

Según lo establecido en el artículo 27 del Estatuto de la AESA, los miembros del Comité Científico y de los Grupos de Expertos no percibirán remuneración alguna por el ejercicio de sus funciones, si bien, podrán percibir indemnizaciones que por razón del servicio les correspondan de acuerdo con la normativa vigente, o en su caso, el abono de los gastos, debidamente justificados, que les ocasione el ejercicio de sus funciones.

Apoyo del Centro Nacional de Alimentación y de las Redes de Instituciones Colaboradoras

El Centro Nacional de Alimentación, como laboratorio oficial español adscrito a la AESA, así como las redes de instituciones colaboradoras creadas por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, darán apoyo y soporte científico-técnico a los trabajos de evaluación de riesgos alimentarios y/o de investigación encomendados al Comité Científico y a los Grupos de Expertos. La relación entre el Comité Científico y el Centro Nacional de Alimentación y otras redes de instituciones colaboradoras deberá realizarse a través de la AESA.

Normas sobre independencia y confidencialidad de los miembros del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria

La independencia de los miembros del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y la confidencialidad en relación con los datos, informaciones y deliberaciones de las que tengan conocimiento por pertenecer a dicho Comité, son dos exigencias que vienen impuestas no sólo por la Ley, sino también por la propia naturaleza de la función a desarrollar.

En efecto, la Ley 11/2001, de 5 de julio, por la que se crea la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, alude a ellas en los párrafos c) y d) del artículo 4.6 indicando que el Estatuto establecerá el procedimiento de este deber. Efectivamente, a ambas se refiere también, en concreto, los artículos 25 y 36 del Real Decreto 709/2002, de 19 de julio, por el que se aprueba el Estatuto de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria.

La independencia se impone como una condición necesaria para satisfacer los principios de eficacia, excelencia y adecuación de los miembros del Comité a las funciones requeridas, así como la disponibilidad objetiva para el adecuado ejercicio de su función.

Con mayor razón se impone la independencia con respecto a cualquier clase de intereses, directos o indirectos, con la industria alimentaria o cualquier institución pública o privada relacionada con la alimentación, precisamente para garantizar aquella objetividad a la que antes se ha hecho referencia.

Es por todo esto absolutamente necesario que el "principio de transparencia" impere en el Comité Científico y sean conocidas por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria las actividades de los miembros del mismo que puedan estar relacionadas con el mundo de las industrias alimentarias o con instituciones públicas o privadas de ámbito alimentario.

En cuanto a la confidencialidad se justifica, obviamente, por los graves perjuicios, que podrían resultar para las industrias alimentarias o cualquier institución pública o privada relacionada con la alimentación, la inexistencia de la obligación de guardar secreto durante la elaboración de los dictámenes científicos, evaluaciones de riesgos alimentarios y definición de ámbitos de los trabajos de investigación, dada la gran importancia que tiene en estos temas la documentación técnica, tanto desde el punto de vista científico como económico.

De acuerdo a lo establecido en el artículo 36 del Real Decreto 709/2002, de 19 de julio, por el que se aprueba el Estatuto de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, los miembros del Comité Científico guardarán secreto de las deliberaciones así como de todos los datos o informaciones de los que tuviesen conocimiento en el ejercicio de sus funciones.

Es preciso, igualmente, compatibilizar la obligación de mantener secreto, con la necesidad de difusión y consulta de informes, documentos y acuerdos de la Agencia de acuerdo con el Artículo 35 del Real Decreto 709/2002 antes citado.

En relación con lo anterior, se adjuntan los modelos de "Compromiso de confidencialidad" y "Declaración pública de intereses", que deben cumplimentar los miembros del Comité Científico y los expertos externos de los Grupos de trabajo y entregar en la Secretaría Técnico Científica del Comité.

Compromiso de confidencialidad de los miembros del Comité Científico

D.....
con DNI N°.....
como miembro del COMITE CIENTIFICO DE LA AGENCIA ESPAÑOLA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA,
SE COMPROMETE :

De acuerdo a lo establecido en el artículo 36 del Real Decreto 709/2002, de 19 de julio, por el que se aprueba el Estatuto de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, a guardar la más estricta confidencialidad sobre las deliberaciones así como de todos los datos o informaciones de los que tuviesen conocimiento en el ejercicio de sus funciones.

Para que así conste firma el presente documento en, a ... dede 20....

Fdo.:

Declaración pública de intereses de miembros del Comité Científico

Nombre:.....

Cualificación:.....

Dirección profesional:.....

.....

Indique a continuación todos los intereses que tenga usted con la industria alimentaria 1 , si procede:

1.- Puesto de trabajo en la industria alimentaria en los últimos 5 años:

.....

2.- Intereses económicos en el capital de una empresa alimentaria:

.....

3.- Trabajos remunerados que desempeñe o haya desempeñado usted para una industria alimentaria en los últimos 5 años:

.....

4.- Otras actividades relacionadas con su trabajo profesional que usted considere que deben ser puestos en conocimiento de la Agencia:

.....

Yo, el abajo firmante,

Declaro por mi honor que, por lo que obra en mi conocimiento, el/los único(s) interés/intereses directo(s) o indirecto(s) que tengo en la industria alimentaria que puede(n) afectar al cumplimiento objetivo de mis responsabilidades con la Agencia es/son el/los que acabo de enumerar.

Declaro además que, en caso de que aparezca que tengo o que he adquirido intereses adicionales que haya que poner en conocimiento de la Agencia, los declararé inmediatamente.

Hecho en, ade.....de 20....

Fdo.:

1 Si no tiene usted intereses en la sección correspondiente, indique "ninguno"

ANEXO II

Procedimiento previo de selección de solicitudes de informe de evaluación de riesgos alimentarios

El objetivo del presente procedimiento es sistematizar la recogida, análisis y priorización de todas las solicitudes de evaluación de riesgos que son recibidas por la AESA o que solicita la propia AESA.

Las solicitudes de informe de evaluación de riesgos alimentarios, una vez recibidas en la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, se canalizarán a la Subdirección General de Coordinación Científica, Unidad responsable de la realización de este procedimiento.

Las solicitudes de informe al Comité Científico podrán estar realizadas:

1. Por la propia Agencia para posibilitar el desarrollo de sus funciones:

- Presidencia
- Dirección Ejecutiva
- Consejo de Dirección
- Comisión Institucional
- Consejo Consultivo
- Subdirección General de Gestión de Riesgos Alimentarios
- Subdirección General de Coordinación de Alertas y Programación del Control Oficial
- Centro Nacional de Alimentación

2. Por entidad externa (solicitud externa), para facilitar la mejor evidencia científica a las distintas Administraciones; para establecer condiciones en el uso de los productos y procedimientos sometidos a una autorización previa o inclusión en una lista positiva de acuerdo con la legislación que les sea de aplicación y, en general, para facilitar la toma de decisiones en relación con la gestión de riesgos alimentarios. Pueden ser solicitadas por:

- Centros Directivos del Ministerio de Sanidad y Consumo
- Otros Departamentos
- Comunidades Autónomas
- Sectores de la industria alimentaria
- Industrias alimentarias o relacionadas directamente con la alimentación
- Asociaciones de consumidores

Las solicitudes irán acompañadas de la documentación que justifique la necesidad del informe y de los datos científicos y referencias bibliográficas, que permitan efectuar la evaluación del riesgo.

Las solicitudes externas a la Agencia Española de Seguridad Alimentaria se canalizarán a través de los Órganos de la Agencia, Comisión Institucional o Consejo Consultivo, según los casos.

Las solicitudes de informe de evaluación de riesgos alimentarios, una vez recibidas en la AESA, se canalizarán a la Subdirección General de Coordinación Científica, Unidad responsable de la realización del procedimiento.

Recepción y registro

Una vez recibida la solicitud, la Subdirección General de Coordinación Científica la dará de alta en un sistema de seguimiento de solicitudes y en la base de datos de seguimiento de solicitudes de infor-

me, de forma que se pueda efectuar su seguimiento desde la recepción hasta la emisión del dictamen del Comité Científico y su publicación.

Evaluación de la solicitud

La Subdirección General de Coordinación Científica valorará la pertinencia de la solicitud y propondrá al Director Ejecutivo su admisión, modificación o rechazo en el plazo de 15 días desde la recepción. Esta evaluación puede tener los siguientes resultados:

Admisión de la solicitud

En el caso de que se proponga la admisión de la solicitud, esta se acompañará de la propuesta de creación de un Grupo de Expertos en el seno del Comité Científico, de acuerdo a lo indicado en el apartado Creación y funcionamiento de los Grupos de Expertos de este documento.

Modificación de la solicitud

Cuando se reciban varias solicitudes sobre el mismo tema o que tengan total o parcialmente el mismo objeto, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria propondrá modificaciones para llegar, de acuerdo con los solicitantes, a una solicitud definitiva, que pasará al trámite de admisión.

Rechazo de la solicitud: Cuando se proponga el rechazo de la solicitud se acompañará de informe motivado. Los motivos del rechazo de la solicitud deberán comunicarse al solicitante en el plazo más breve posible. Las solicitudes de evaluación y dictamen del Comité Científico podrán ser rechazadas por alguno de los siguientes motivos:

- Proceder de un solicitante no cualificado para ello
- Plantear cuestiones que no sean competencia de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria
- La documentación no es suficiente o no es clara
- Otros motivos justificados

Documentación insuficiente: En el caso de que la documentación sea insuficiente la Agencia Española de Seguridad Alimentaria podrá requerir al solicitante a que la complete en el plazo máximo de dos meses.

Opinión del Comité Científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia, en relación con los factores favorecedores de la aparición de alergia a *Anisakis*, así como de las medidas de prevención aplicables

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver (Presidente). Juan José Badiola (Vicepresidente). Arturo Anadón Navarro, Margarita Arboix Arzo, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Francesc Centrich Escarpenter, José Luis García López, M^a Luisa García López, Manuela Juárez Iglesias, Manuel Martín Esteban, Juan Antonio Ordóñez Pereda, Andrés Otero Carballeira, Fernando Rodríguez Artalejo, Elías Rodríguez Ferri, José Manuel Sánchez Vizcaíno Rodríguez, Vicente Sanchis Almenar, Gregorio Varela Moreiras, Gonzalo Zurera Cosano.

Grupo de Trabajo

M^a Luisa García López
Manuel Martín Esteban (coordinador)
Fernando Rodríguez Artalejo
Elías Rodríguez Ferri

Resumen

La anisaquiosis es una parasitosis que se produce por pescado parasitado por larvas de *Anisakis spp.*, consumido crudo o insuficientemente cocinado. Es un problema sanitario especialmente importante en países con un elevado consumo de pescado. En España se detecta aproximadamente en un tercio del pescado muestreado en lonjas de puertos. El parásito adulto se encuentra en el tubo digestivo de una gran variedad de mamíferos marinos, que actúan como hospedadores definitivos. Las larvas maduran en el agua y son consumidas por pequeños crustáceos que sirven de alimento a diversas especies de peces y cefalópodos, en los que alcanzan el estadio de L3. El ciclo se completa cuando los hospedadores definitivos adquieren los intermediarios portadores de L3. El hombre es un hospedador ocasional a consecuencia de ingerir pescados contaminados y en él la larva no puede completar su ciclo vital.

Los síntomas y signos clínicos se desarrollan como resultado de la reacción inflamatoria ocasionada por la penetración de las larvas en la mucosa de la pared gástrica. También puede producir manifestaciones de reacción alérgica (hipersensibilidad) de tipo inmediato que van desde la urticaria o angioedema al choque anafiláctico, así como cuadros mixtos con clínica gastrointestinal y alérgica. En el paciente se detectan fundamentalmente anticuerpos de clase IgE dirigidos frente a antígenos de las diversas estructuras de la larva de *Anisakis*. Sin embargo, los sujetos asintomáticos pueden presentar también valores elevados de IgE específica frente a antígenos de *Anisakis*, incluso sin haber estado en contacto con el parásito, debido a la reactividad cruzada de algunos de sus alérgenos, como las tropomiosinas, con las de otras especies. Parece que la respuesta frente al antígeno secretor-excretor de la larva viva es la más específica y la mejor relacionada con una patología actual.

Las medidas para la reducción del riesgo asociado con la contaminación de los pescados con larvas de *Anisakis* deben contemplarse tanto a nivel de producción primaria (áreas, tipos de capturas y prácticas de capturas), como en la manipulación a bordo o en tierra, procurando una rápida eviscera-

ción y lavado de la cavidad abdominal. Se ha demostrado la eficacia de la congelación rápida junto con la permanencia a una temperatura igual o inferior a -20°C al menos durante 24 horas, aunque algunos autores opinan que debe mantenerse hasta una semana, para la destrucción de las larvas de *Anisakis*. El tratamiento térmico (llegando a 60 o 70°C en el centro de la pieza durante unos segundos) y las altas presiones (200 Mpa, 10 minutos) son también eficaces. No lo es la irradiación, al menos que se apliquen dosis elevadas que, por otra parte, afectan negativamente a la calidad organoléptica del pescado. Tampoco son suficientes la salazón y la acidificación (vinagre).

Respecto al consumidor, éste no debe consumir pescado crudo que no se haya congelado previamente en las condiciones citadas, ni pescado fresco que no se haya cocinado a más de 60°C durante un mínimo de 15 a 20 minutos. El cocinado a la plancha o en microondas son procedimientos menos seguros que la cocción o la fritura.

Palabras clave

Alergenos. Alergia alimentaria. *Anisakis*. Anisakuosis. Parasitosis. Pescado. Prevención.

Introducción

La familia *Anisakidae*, incluye nematodos redondos, de cuerpo no segmentado, parásitos de peces capaces de producir problemas clínicos en los humanos como consecuencia del consumo de pescado parasitado. En conjunto, la enfermedad recibe el nombre de anisakidosis o anisaquiosis; si la parasitación implica los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum*, las denominaciones correctas son, respectivamente, anisakiosis (anisaquiosis), pseudoterranovosis y contracecosis [1].

En el género *Anisakis* se incluye *A. simplex*, de menor interés por la frecuencia de su implicación, *A. physeteris*. *A. simplex* se considera un complejo, al que se acostumbra a referir como *A. simplex* 'sensu lato' (s.l.), que incluye *A. simplex* 'sensu stricto' (s.s) (*A. simplex* B), *A. pegreffi* (*A. simplex* A) y *A. simplex* C. Aunque no se dispone de mucha información al respecto, parece que por su abundancia en el hemisferio norte, *A. simplex* (s.s.) es la especie más importante desde el punto de vista sanitario.

1. El ciclo biológico

El parásito adulto suele encontrarse en el estómago de gran variedad de mamíferos marinos que actúan como hospedadores definitivos, en particular cetáceos (delfines, ballenas, marsopas, orcas, narvales, cachalotes, etc.) y más raramente pinnípedos (focas, leones marinos, morsas, etc.). Los huevos del parásito, no embrionados, acceden al agua de mar envueltos en las heces y en este medio tiene lugar su desarrollo embrionario que necesita de dos mudas (L1 a L2 y L2 a L3), las cuales se producen dentro del huevo y, ya en forma de L3, se liberan al medio después de la eclosión.

Las L3 pueden sobrevivir en el agua no más de una semana a 24°C y hasta 14 semanas a una temperatura de 4-10°C. Para que el ciclo continúe han de ser ingeridas por un hospedador intermediario, bien directamente (en el caso de eufásidos, un tipo de pequeños crustáceos) o indirectamente a través de un copépodo que actúa como un hospedador de transporte (o paraténico) que sirven como alimento a los crustáceos. En los crustáceos, las L3 pierden su vaina cuticular y completan su desarrollo en el hemocele.

Los crustáceos eufásidos o los copépodos sirven de alimento de peces teleósteos (principalmente) y cefalópodos, a los que pasan las L3 y se comportan como nuevos hospedadores paraténicos de esta fase. Una vez ingeridas, en el caso de los calamares por ejemplo, las L3 se implantan en la pared externa del estómago o en la musculatura del manto, mientras que en los peces teleósteos forman espirales bajo el tejido conectivo del hígado y otras vísceras, sin descartar su integración en la musculatura esquelética o moviéndose libremente en la cavidad corporal.

Entre las numerosas especies de peces y cefalópodos en las que se han descrito parasitaciones por la L3 de *A. simplex*, algunas son de importancia comercial como el arenque, la sardina, el boquerón, el bacalao, el salmón, la merluza, el abadejo, el rape, el bonito, la caballa, el rodaballo, la bacaladilla, el besugo, la gallineta, la brótola, el calamar, etc., con índices de parasitación importantes, que en algunos casos llegan al 30% o más [2]. Se ha descrito una cierta relación entre grado de parasitación y la edad y tamaño del pez, aunque (al menos en algunos casos, como en el bacalao) también se citan límites.

Las larvas L3 pueden observarse enrolladas en espiral plano en el músculo o vísceras de los peces o cefalópodos. Morfológicamente su cuerpo es cilíndrico, blanquecino y de unos 30 mm de longitud;

sin embargo, cuando están encapsuladas en la musculatura de los peces, varía su aspecto, adaptando en ocasiones un color pardo [3].

El ciclo se completa cuando los hospedadores definitivos (cetáceos y pinnípedos, fundamentalmente) ingieren los intermediarios portadores de L3. En los mamíferos marinos las L3 penetran en la mucosa del estómago y ahí sufren las dos últimas mudas (L3 a L4 y L4 a L5) alcanzando la forma adulta y la madurez sexual.

El hombre es un hospedador ocasional, debido a la ingestión de pescados contaminados. En él la larva L3 no puede completar su ciclo vital. El contagio y la transmisión de *A. simplex* y de la anisakidosis correspondiente se asocia al consumo de pescado crudo o ligeramente curado o condimentado. Son hábitos alimentarios que se corresponden sobre todo con culturas orientales, como sucede en Japón, pero también en otros lugares. De este modo el consumo de *sushi* o de *sashimi* en el caso del Japón, de arenques salados o escabechados en el de Holanda, de *gravlax* en Noruega, Finlandia o Suecia, de boquerones en vinagre en España, de *lomi-lomi* en Hawai o de *ceviche* en varios países de América latina, se atribuye habitualmente como causa probada de contagio. En ocasiones también se han considerado los moluscos (mejillón, ostra) y crustáceos (langosta, cigala) como posibles transmisores, aunque no ha podido confirmarse.

2. Antígenos (alergenos) de Anisakis

Las L3 y L4 de *A. simplex* incluyen muchos componentes antigénicos con capacidad para inducir una respuesta inmune por parte del hospedador parasitado, aunque su grado de adaptación evolutiva hace que la variabilidad sea la norma habitual, tanto en dependencia del parásito como del hospedador.

Desde el punto de vista estructural y funcional *A. simplex* agrupa tres tipos de antígenos:

1. Antígenos Somáticos. Son los antígenos más abundantes con un peso molecular entre 13-150 kDa. Algunas de estas proteínas presentan reactividad cruzada con otros ascáridos. Estos antígenos se obtienen por homogeneización de las larvas enteras y contienen todas las proteínas solubles del parásito [4]. Sólo resultan funcionales después de la muerte y degradación histolítica del parásito.
2. Antígeno ES (de excreción-secreción). Son moléculas procedentes del propio parásito y que se liberan al medio durante la infección. Se sintetizan en dos estructuras corporales, la glándula esofágica dorsal o las células secretoras del tracto digestivo, las cuales constituyen la mayor fuente de enzimas histolíticas (con actividad proteolítica e hialuronidasa). Estas moléculas ayudan al parásito a penetrar en la mucosa gástrica y pueden degranular mastocitos en ratones sensibilizados. Los anticuerpos frente a estos antígenos son los primeros en aparecer [5]. Este complejo antigénico puede obtenerse mediante incubación de las larvas vivas en un medio de cultivo apropiado durante largos periodos de tiempo en el que es liberado por las larvas [4, 6]. Los pesos moleculares de las proteínas de este antígeno son diversos, pero se ha demostrado que las de bajo peso molecular (14, 17 y 18 kDa) sólo son reconocidas por los sueros de los ratones infectados con la larva viva del *A. simplex*. Una explicación puede ser que los antígenos con bajo peso molecular se producen únicamente cuando la larva esta viva [5].
3. Antígenos de Superficie. Corresponden a moléculas expresadas en la cutícula del parásito, que también se encuentran en otros nematodos. Este antígeno se expresa cuando ha tenido lugar la ecdisis, es decir,

la transición interlarvaria (de L3 a L4). Aunque se ha sugerido que son menos antigénicas y específicas que los antígenos ES y somático, se ha demostrado en estudios recientes que son fuente de muchas proteínas reconocidas por los anticuerpos del ratón infestado. Posiblemente estas moléculas juegan un papel importante en el desarrollo de un estímulo crónico, como en el caso de los granulomas [7].

La mayor abundancia y funcionalidad en la respuesta inmune corresponde a los antígenos somáticos o internos. Entre estos se incluyen numerosas proteínas de tamaño variable, entre 13 y 150 kDa. Las moléculas más pequeñas sólo son reconocidas por el suero de animales infectados experimentalmente con larvas L3 vivas, lo que sugiere su producción en el curso de la infección. En *A. simplex* se ha descrito un antígeno complejo de pequeño tamaño (14 kDa), de origen tanto ES como somático, cuya función principal parece relacionarse con el transporte de lípidos en el líquido pseudocelómico y tejido conectivo. También se ha observado que mientras los antígenos ES y de superficie son poco específicos, los somáticos lo son mucho más, considerándose componentes muy conservados durante el proceso de desarrollo del parásito [8].

En el suero de pacientes con anisakiosis se detectan grandes cantidades de IgE específica para determinados antígenos de *A. simplex*, por lo que se considera que se trata de verdaderas reacciones de hipersensibilidad o alergia de tipo I (inmediata). En el pasado reciente ha existido cierta controversia acerca del origen de los alérgenos de *A. simplex*, ya que varios informes preliminares [9, 10] sostenían la relación entre antígenos termoestables, procedentes de larvas muertas capaces de soportar las condiciones del cocinado, y la presencia de las manifestaciones alérgicas en pacientes sensibilizados. Más recientemente, sin embargo, diversos experimentos parecen concluir que sólo la presencia de larvas vivas en el pescado de consumo pueden originar respuestas alérgicas [11-13] y que aquellos casos en los que se descubre IgE específica en un paciente, sin presencia aparente de síntomas, deben interpretarse, simplemente, como situaciones de parasitación que pasaron desapercibidas [14, 15]. Parece, por lo tanto, que es necesaria la infección activa para que se desencadene una reacción alérgica o, lo que es lo mismo, que los alérgenos de *A. simplex* sólo interactúan con el sistema inmune del hospedador cuando el parásito los inocula en sus tejidos.

Se han identificado, al menos, cuatro antígenos con capacidad alergénica (alérgenos principales) [16] que incluyen productos de peso molecular (PM) relativamente pequeño. **Ani s 1** posee un PM de 24 kDa [17] y se ha encontrado en la glándula excretora, constituyendo el antígeno SE citado [18]. **Ani s 2**, también denominado paramiosina, se encuentra en el cuerpo de la larva y tiene un PM de 97 kDa [19]. **Ani s 3** corresponde a una tropomiosina, con un PM de 41 kDa [20, 21]. **Ani s 4** es un alérgeno de bajo PM (9 kDa) procedente del cuerpo de la larva, resistente al calor y a la pepsina, lo que podría explicar la aparición de síntomas después de la ingestión de pescado bien cocido o en conserva [22]. Mención aparte merece la aportación de Lorenzo [14] acerca de la presencia de alérgenos de alto peso molecular, de hasta 154 kDa, reconocidos por el anticuerpo monoclonal UA3 que además de inducir fundamentalmente IgE, parece que también potencian la formación de IgG4 e IgG1.

3. Aspectos clínicos y diagnósticos

El hombre se contagia cuando consume pescado crudo o insuficientemente cocinado, parasitado con L3. Pueden encontrarse L3 en el tracto gastrointestinal humano, en el que incluso se han descrito L4

y formas de transición L3 a L4, lo que prueba que aunque no se trata de un hospedador definitivo ideal, si permite que, en condiciones adecuadas, continúe el desarrollo larvario.

En contraste con otras infecciones por nematodos, la enfermedad puede deberse a un solo parásito, aunque se han descrito infestaciones masivas [23, 24].

Los síntomas se desarrollan como resultado de una reacción inflamatoria, cuando la cabeza de la larva se adhiere o penetra en la mucosa del tubo digestivo. Las manifestaciones clínicas dependerán de la zona del tubo digestivo donde se localice la larva y del tipo de reacción a que de lugar.

El sitio de localización más frecuente es el estómago [25, 26] o, también, el intestino [27, 28]. La anisakirosis gástrica se caracteriza por dolor abdominal de tipo cólico, localizado en epigastrio, que puede acompañarse de náuseas, vómitos y, si también afecta al intestino delgado, de alteraciones del ritmo intestinal. En este caso, el diagnóstico puede confirmarse mediante endoscopia, con visualización del parásito, cuya extracción hará desaparecer los síntomas. Cuando el proceso presenta un curso crónico, la formación de abscesos o granulomas gástricos [29] o intestinales puede simular cuadros de pseudoobstrucción intestinal, apendicitis aguda o episodios de enfermedad inflamatoria intestinal [30-32]. Se han descrito cuadros extradigestivos en relación con la penetración de la larva a través de la pared del tubo digestivo y su migración a pulmón, hígado u otros órganos [33].

La larva de *A. simplex* puede producir también una reacción alérgica de tipo inmediato, mediada por IgE, dando lugar a manifestaciones sistémicas que van desde la urticaria o angioedema hasta el choque anafiláctico [34, 35]. Se han descrito casos de enfermedad ocupacional (asma y conjuntivitis) por sensibilización a *A. simplex* [36, 37], así como dermatitis de contacto [38] y artralgias tras la exposición al parásito [39]. En la historia clínica de estos pacientes es característico el antecedente próximo (minutos u horas) de la ingestión de pescado fresco o poco cocinado; asimismo, refieren buena tolerancia en varias ocasiones al pescado aparentemente implicado.

Algunos pacientes presentan un cuadro mixto de urticaria y/o angioedema (síntomas alérgicos) acompañado de clínica abdominal (epigastralgia, vómitos, etc.), que se ha descrito como "anisakirosis gastroalérgica" [11, 40]. En esta situación los síntomas digestivos suelen preceder a los de estirpe alérgica, con una latencia media respecto a la ingestión del pescado parasitado de 3 horas y 5 horas, respectivamente.

El hemograma suele permanecer dentro de los parámetros establecidos como normales, aunque la fórmula leucocitaria puede mostrar leucocitosis con neutrofilia y eosinofilia no muy intensa, observándose en algunos casos un aumento posterior de la cifra de eosinófilos a partir de las 24 horas del inicio del cuadro clínico. Las determinaciones bioquímicas no suelen verse alteradas, salvo que sean secundarias a complicaciones del tipo pseudo-obstrucción (vómitos de repetición). Los niveles séricos de proteína catiónica del eosinófilo pueden estar muy elevados, aunque esta determinación no es de uso habitual [41].

Las pruebas de diagnóstico por imagen no suelen ser necesarias. En los cuadros intestinales sería de elección la ecografía, aunque los signos observados son inespecíficos: engrosamiento de la pared intestinal, líquido libre, estrechamiento de la luz y disminución del peristaltismo [41].

En todas estas situaciones se obtiene una prueba cutánea positiva, realizada, como norma general, mediante punción (*prick-test*) frente a antígeno somático de *A. simplex*. Se acompaña de unos

valores elevados de IgE específica para *A. simplex*, y de una importante elevación de la tasa de IgE sérica total [42, 43]. Sin embargo, estos datos tienen una baja especificidad y no constituyen, por sí mismos, un signo de enfermedad o de parasitación actual por *A. simplex*, sino que deben valorarse en el contexto de los antecedentes y del cuadro clínico del paciente. A diferencia de otras situaciones como, por ejemplo, la alergia alimentaria, la prueba de provocación no es útil ni practicable, ya que, obviamente, no es posible utilizar larvas vivas y, con larvas muertas, no se ha conseguido reproducir los síntomas [13, 44].

La determinación seriada de IgE total y de IgE específica frente a *A. simplex* puede ser útil en el diagnóstico de la parasitación aguda. Daschner *et al.* [45] determinaron ambos parámetros a las 24 horas y un mes después de la reacción, objetivando un incremento de la IgE total en un 85,36% (35/41) de pacientes y de la IgE específica en el 90,24% (37/41). En el 89% de los pacientes con gastroscopia positiva se produjo un aumento de IgE total y específica ($p=0,02$), siendo éste mayor que el de los pacientes de gastroscopia sin hallazgo de parásito.

En la baja especificidad de prueba cutánea e IgE específica tiene considerable importancia la presencia de determinados antígenos, como tropomiosina, en las larvas de *A. simplex*. Se ha relacionado a la tropomiosina existente en el *A. simplex* con la reactividad cruzada que presenta este parásito con otros artrópodos como *Blatella germanica* y *Chironomus spp. larvae*, demostrada mediante estudios de inhibición de fijación de IgE específica e inhibición de inmunotransferencia [46]. También estaría relacionada con los ácaros, en mayor medida, *Acarus siro* y *Tyrophagus putrescentiae*, la cucaracha y la gamba [20, 47].

En diversos estudios, basados en técnicas de ELISA y de inmunotransferencia, se ha considerado al antígeno somático como responsable de la existencia de reactividad cruzada entre el *A. simplex* y otros nematodos, como *Ascaris suum*, *Toxocara canis*, *Hysterothylacium aduncum*, *Trichinella spiralis* y *Trichuris muris* [48, 49]. También están presentes en otros nematodos las enzimas con grupo biotina contenidas en los extractos del antígeno somático del *A. simplex* [50].

Los carbohidratos del extracto de *A. simplex* utilizado para el diagnóstico pueden ser los responsables de los falsos positivos de las pruebas diagnósticas. La reactividad cruzada existente entre el antígeno de cuerpo entero de *A. simplex* con otros alérgenos, hace necesaria la utilización de otros antígenos para la realización de las pruebas cutáneas y la determinación de IgE específica, con el objetivo de disminuir la elevada tasa de falsos positivos. El tratamiento previo con periodato (sustancia que destruye las estructuras carbohidratadas) hace desaparecer una banda de peso molecular medio reconocida en inmunotransferencia por sujetos asintomáticos [51]. Otros autores, usando anticuerpos monoclonales han obtenido los mismos resultados. Al eliminar los epítopos o-glicanos para el monoclonal UA3, anticuerpo que reconoce dos proteínas de peso molecular de 139 y 154 kDa del *A. simplex*, desaparece en gran medida el problema de la reactividad cruzada [52].

Algunos datos parecen indicar que la utilización selectiva del antígeno secretor-excretor puede aumentar considerablemente la especificidad de las técnicas diagnósticas, ya que sólo se detecta IgE específica frente a este alérgeno en pacientes con anisakisosis gástrica o gastroalérgica [53], pero no es una proteína reconocida por el suero de individuos asintomáticos con prueba cutánea e IgE específica positivas frente al antígeno de cuerpo entero de *A. simplex* [17].

Factores asociados

La anisaquiosis es un problema sanitario especialmente importante en aquellos países con elevado consumo de pescado. Es en Japón, por razones obvias (consumo de pescado crudo), donde se contabilizan más del 95% del total de casos denunciados en el mundo. En su conjunto, la cifra de casos descrita en EE.UU. y Europa se puede considerar discreta (alrededor de 50 casos en EE.UU. y unos 600 en Europa) aunque en el viejo continente la casuística se concentra en algunos países concretos como Holanda, Alemania, Francia o España con una tendencia que se considera creciente, entre otras razones, por el mejor conocimiento de la enfermedad por parte de los médicos y la disponibilidad de mejores instrumentos para llevar a cabo el diagnóstico (por ejemplo la toma de muestras por endoscopia), así como por el desarrollo creciente de una metodología de laboratorio cada vez más sensible y específica, sin olvidar la globalización del suministro de alimentos. En España los primeros casos notificados de anisaquiosis y alergia debidos a *A. simplex* se refirieron en 1991 y 1995 [9, 54].

La frecuencia y distribución de los problemas clínicos derivados de la exposición a *Anisakis* puede inferirse a partir de tres fuentes de información:

- a) La distribución de la contaminación de los alimentos, ya sea en origen (crudos) o después de preparados para el consumo.
- b) La distribución de anticuerpos (IgG e IgE) frente a *A. simplex* en sujetos asintomáticos, en la población general o en sujetos que consultan en el sistema sanitario por cuadros gastrointestinales o alérgicos.
- c) La distribución de las formas clínicas derivadas de la infestación, tanto la anisaquiosis invasiva como los cuadros alérgicos (urticaria, angioedema, etc..) en población consultante en el sistema sanitario.

La infección por *A. simplex* presenta distribución mundial y afecta al pescado crudo o poco cocinado. Los principales pescados implicados dependen de las zonas. Por ejemplo, en Japón los principales son la caballa y, menos, el calamar, mientras que en EE.UU. es el salmón del Pacífico. En España se puede encontrar en el 36% del pescado muestreado en lonjas de los puertos y su frecuencia es mayor en los de mar Cantábrico (50%) y océano Atlántico (36%) y sustancialmente menor en los del mar Mediterráneo (6%) [55]. No se dispone de estudios epidemiológicos acerca de la frecuencia de *A. simplex* con capacidad infectiva en muestras amplias de productos ya preparados para el consumo, pero parece razonable que varíe con el tipo de pescado y los modos de preparación del mismo. En nuestro país, seguramente por el método de preparación, la mayor parte de los casos se relacionan con el consumo de boquerones aliñados con vinagre y aceite y, menos, en el caso de sardinas aliñadas con limón, merluza y otros pescados insuficientemente cocinados [14].

En adultos españoles, segmento de edad más afectado, la prevalencia de sensibilización a *A. simplex* varía del 6% al 56% según los diversos estudios. La gran variación en los resultados posiblemente se explica, en parte, por diferencias metodológicas entre los estudios y la zona geográfica de los mismos. Por último, tampoco se dispone de análisis de los cuadros clínicos derivados de la exposición a *Anisakis* a partir de la explotación sistemática de los registros de Atención de Primaria o del Conjunto Mínimo Básico de datos al Alta Hospitalaria.

Medidas para la reducción del riesgo asociado con *anisakis*

Como para todos los peligros asociados con los alimentos, se debe contemplar la totalidad de los eslabones de la cadena producción-consumo.

1. Producción primaria

Probablemente es la más difícil de controlar. Sin embargo, a este nivel, la presencia de larvas de *Anisakis* en pescado sin eviscerar puede reducirse:

- 1) Evitando faenar en determinadas áreas, capturar determinadas especies o determinadas tallas de una especie [56]. Se refiere a las especies de peces que con mayor frecuencia están infectadas con *Anisakis*.
- 2) Evaluando y controlando el impacto de la actividad humana en la incidencia del parásito; por ejemplo, la importancia de ciertas prácticas, como arrojar al mar las vísceras infestadas del pescado [57]. Se ha comprobado que en pescado procedente de acuicultura (salmón) alimentado exclusivamente con pienso, la incidencia de larvas de *A. simplex* es prácticamente nula [58].

2. Prácticas durante la captura y manipulación a bordo

- 1) La presencia de larvas de *A. simplex* en músculo de pescado eviscerado se debe a la migración *post-mortem*. Por tanto, es imprescindible que el tiempo que transcurre entre la captura y la evisceración sea mínimo [59].
- 2) La mayor incidencia y número de larvas se detectan en la musculatura hipoaxial. Por ello, la eliminación de esta parte (ventresca o ijada) en las especies que más frecuentemente están infestadas, contribuye a disminuir el riesgo [58, 60, 61].
- 3) La congelación rápida con aire "blast freezing" en el buque es un método eficaz de inactivar las larvas de *Anisakis* aunque es probable que no destruya la capacidad de sensibilización de los antígenos de la larva [59].
- 4) El paquete ovárico (huevas) puede contener larvas vivas pero los huevos, una vez liberados y convenientemente lavados, no contienen el parásito.

3. Pescado fresco. Manipulación en tierra e inspección

- 1) Si no se ha llevado a cabo en el buque, debe procederse a la evisceración y lavado de la cavidad abdominal lo más rápidamente posible tras el desembarque y, si es posible, eliminación de la musculatura hipoaxial. Esto último tiene inconvenientes si se va a comercializar entero (poca aceptación por parte del consumidor) y siempre supone una pérdida de casi el 15% [58, 61, 62].
- 2) Examen visual del pescado eviscerado: cavidad abdominal, hígado y lechazas destinadas al consumo humano [61-63].
- 3) En el caso de filetes, examen visual de la superficie (un número representativo de filetes de la partida) y eliminación de las larvas con un cuchillo [58]. Para detectar las larvas en la profundidad del músculo, practicar un examen por transiluminación [58, 61, 63] aunque éste es menos eficaz para *Anisakis* (larvas pequeñas y blanquecinas) que para otros parásitos como *Phocanema* o *Pseudoterranova* [58]. Se puede concluir que, en esta fase, la evisceración, la inspección visual, la eliminación física de

las larvas y la exclusión de la musculatura hipoaxial pueden reducir el peligro asociado a *Anisakis*, pero no lo eliminan ni lo reducen hasta un nivel aceptable. Por ello, es necesario congelar previamente los productos que se van a consumir crudos o poco procesados (ahumado en frío, escabechado o marinado).

4. Productos de la pesca procesados²⁸⁷ 558ológicos

4.1.1. Congelación

Un número elevado de trabajos demuestra la eficacia de la congelación y el almacenamiento a congelación para inactivar las larvas de *Anisakis*. La eficacia de este tratamiento depende de varios factores como son la temperatura, el tiempo necesario para que el pescado alcance esa temperatura, el tiempo que se almacena el pescado bajo congelación y el contenido en grasa del pescado [61].

La legislación de la UE [62] señala que el pescado que se va a consumir crudo o prácticamente crudo debe congelarse a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ en la totalidad del producto y mantenerse a esa temperatura durante, al menos, 24 horas. Este tratamiento es también obligatorio para productos procedentes de ciertas especies (arenque, caballa, espadín y salmón salvaje del Atlántico o del Pacífico) ahumados en frío (temperatura en el interior de la pieza no sobrepasa los 60°C) y para aquéllos en escabeche o salados cuando el proceso no basta para destruir las larvas.

Aunque no especifica si se aplica antes o después de procesar, parece lógico que se haga antes, ya que la congelación altera los productos procesados. Además, al ahumar y salazonar (sin congelar) las larvas vivas se desplazan y aparecen en la superficie del producto, haciéndolo poco apetecible, aunque sea seguro.

Un aspecto importante es la interpretación de " **$\leq -20^{\circ}\text{C}$ durante, al menos, 24h**", especialmente en restauración colectiva y en los hogares, donde no se usan sistemas rápidos de congelación. Al menos en estos casos, habría que considerar separadamente el proceso de congelación, hasta que se alcanzan los -20°C en un equipo doméstico, y el almacenamiento a congelación. De hecho, en la legislación holandesa que fue la pionera en este tipo de tratamientos, se recogía, para arenque, "*congelar de forma que se alcance $\leq -20^{\circ}\text{C}$ en 12 horas y almacenar, a -20°C , otras 24 horas*" y lo mismo recoge la International Commission on Microbiological Specifications for Foods [64]. En este sentido, Dong *et al.* [65] señalan que, en un frigorífico doméstico, para alcanzar -20°C en filetes de halibut del Pacífico (*Atheresthes stomias*) fueron necesarias 9,5 horas y, al menos, 60 horas para la inactivación total de las larvas. También Wharton y Aadler [66] hacen énfasis en la importancia del tiempo necesario para alcanzar la temperatura de congelación inactivante

La FDA [61] especifica "congelación y almacenamiento a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ durante 7 días" (tiempo total en un congelador convencional) o congelación a $\leq -35^{\circ}\text{C}$ hasta que solidifique y mantenimiento a la misma temperatura durante 15 horas o congelación a $\leq -35^{\circ}\text{C}$ hasta que solidifique y mantenimiento a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Se entiende que a $\leq -35^{\circ}\text{C}$ en un congelador comercial.

En resumen, la eficacia de la congelación para inactivar las larvas de *Anisakis* es incuestionable. De hecho, se considera que la congelación es el único PCC (Punto Control Crítico) eficaz para prevenir la infestación por nematodos cuando se aplica el sistema APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos) a la obtención de determinados productos de la pesca (ahumados en frío, por ejem-

plo) [67, 68]. Sin embargo, en el ámbito doméstico, a la hora de hacer recomendaciones a los consumidores acerca del tiempo que el pescado debe permanecer congelado antes de proceder a escabechar (sin tratamiento térmico previo) o marinar ha de tenerse en cuenta la capacidad de congelación de los frigoríficos domésticos (1 estrella, temperatura mínima alcanzada, -6°C; 2 estrellas, temperatura mínima alcanzada, -12°C; 3 estrellas, temperatura mínima alcanzada, -18°C; 4 estrellas, temperatura mínima alcanzada, -24°C).

4.1.2. Tratamiento térmico

Las larvas de *Anisakis* son sensibles al calor. A 55°C, en pescado, se inactivan en 10 a 60 segundos [58] y a 60°C, en un medio, en 1 segundo [64]. La FDA [68] considera que un tratamiento de 60°C en CCcto durante 1 minuto es suficiente para matar las larvas, recomendando la ICMSF [64] que se alcancen, al menos, 70°C en el centro de la pieza.

Esto significa que los productos cocinados completamente (hervidos o fritos), los ahumados en caliente (temperatura central de la pieza > 60°C), los pasterizados y los cocinados a vacío "sous vide" son seguros desde el punto de vista de la inactivación del parásito. No lo son los productos ahumados en frío o los cocinados de forma inadecuada a la plancha o en microondas. Las microondas llegan hasta un determinado espesor y, a partir de ahí, la transmisión de calor se hace por conducción, por lo que, en las zonas donde no actúan las microondas, la eficacia dependerá únicamente del tiempo y de la temperatura que se alcance.

4.1.3. Irradiación

Las larvas de *Anisakis* son más resistentes que las de otros parásitos, requiriéndose tratamientos de hasta 10 kGy [68]. Hay que considerar que las radiaciones ionizantes afectan negativamente a la calidad organoléptica del pescado.

4.1.4. Altas presiones

Los tratamientos con altas presiones son eficaces para inactivar las larvas de *A. simplex* aunque afectan al color y al aspecto del producto. En la mayoría de los estudios realizados, la aplicación de 200 MPa inactivaba el 100% de las larvas en 3 a 10 minutos [65, 69].

4.2. Efecto de conservadores

4.2.1. Salazón

Aunque *A. simplex* es sensible a la sal se necesitan elevadas concentraciones durante un periodo prolongado para inactivar las larvas. Algunos datos sobre el efecto del NaCl se recogen a continuación.

| % NaCl en la fase acuosa del tejido muscular (WPS-Water Phase Salt) [58, 64] | Tiempo máximo de supervivencia |
|---|-----------------------------------|
| 4-5 | 6 - > 17 semanas |
| 6-7 | 10-12 semanas |
| 8-9 | 5-6 semanas |
| 15 | 4 semanas |
| 20 | 3 semanas |

La salazón en seco inactiva las larvas de la superficie pero, si no es prolongada, generalmente no inactiva las del interior [68].

La sacarosa también inactiva al parásito pero se necesitan concentraciones del 12% durante, al menos, 35 días [64].

4.2.2. Acidificación

De los trabajos publicados se deduce que se necesitan 35 días para inactivar las larvas cuando las condiciones del procesado son: 2,4% de ácido acético (pH de la fase acuosa del músculo, 4,2) y 6% de NaCl [64]. De ello se puede concluir que la sal y el vinagre pueden reducir el peligro asociado a *Anisakis*, pero no lo eliminan ni lo reducen hasta un nivel aceptable. Por ello, es necesario congelar previamente los productos que se van a escabechar o marinar.

Recomendaciones al consumidor y a la restauración colectiva

Las recomendaciones para evitar la **infección por *Anisakis*** parecen claras: todos aquellos procedimientos que garanticen la inactivación de las larvas. En el caso de los **episodios alérgicos** es más difícil puesto que no existe un criterio unánime respecto a la causa que genera la reacción de hipersensibilidad. Así, un número importante de trabajos señalan que es preciso el contacto con el parásito vivo y, al parecer, es necesario, además, que se fije en la submucosa del intestino [7, 12, 70]. Sin embargo, otros autores [71, 72] consideran que los tratamientos que inactivan las larvas no son suficientes para destruir su capacidad alergénica y en este sentido se pronunció el Comité Científico de Veterinaria de Salud Pública [59].

En cualquier caso, son varios los estudios que ponen de manifiesto que los tratamientos inactivantes, especialmente la congelación, parecen ser una alternativa eficaz para prevenir la presentación de los síntomas alérgicos [7, 70, 73, 74].

1. Recomendaciones para la población general

- 1) Para pescados y cefalópodos frescos, es conveniente conocer los criterios de frescura (ojos, agallas, consistencia y piel), para así adquirir los especímenes que hayan sido capturados más recientemente (menor tiempo para la migración al tejido muscular).
- 2) Para pescados de tamaño mediano y grande, procurar adquirirlos eviscerados. Si no lo están, hacerlo inmediatamente. En todos los casos, lavar la cavidad abdominal, examinar visualmente los músculos abdominales y, si es necesario, eliminar la musculatura hipoaxial (ventresca) (eliminación física de las larvas). Cocinar o congelar inmediatamente.
- 3) No consumir pescados ni cefalópodos crudos ni productos de la pesca ahumados en frío, marinados, en vinagre, ceviche, sushi, o procesados de cualquier otra forma que no garantice la inactivación del parásito, salvo que éstos hayan sido sometidos a congelación comercial o se hayan congelado a -20°C durante una semana (frigoríficos de 3 o 4 estrellas). Comprobar la temperatura del congelador durante el almacenamiento.
- 4) Asegurar un tratamiento térmico completo mediante cocción o fritura. En restauración, utilizar termómetros de cocina o instrumentos medidores tiempo/temperatura, que se insertarán en el centro

de la porción más gruesa. Si no se dispone de termómetro, comprobar que el pescado está “bien hecho”, pinchando la pieza con un tenedor o un cuchillo; la carne debe desprenderse fácilmente de la espina y tener un color opaco. Una regla general son 10 minutos para piezas de unos 2,5 cm de grosor, dando la vuelta a los 5 minutos. Cocinar 5 minutos más si se trata de salsas o “en papillote”.

El cocinado a la plancha y en microondas es menos seguro que la cocción completa o la fritura. En el caso de tratamiento a la plancha hay que comprobar que está “bien hecho”. En el caso del horno microondas, las recomendaciones generales son: 1) elegir la temperatura de forma que sea 14°C superior a la recomendada (en este caso, 74+14°C); 2) cocinar el pescado cubierto de forma apropiada –el calor húmedo es más eficaz– y dándole una o dos vueltas durante la cocción (evita los puntos fríos); 3); una vez cocinado, dejar reposar en el horno la pieza cubierta, al menos, dos minutos para que la temperatura pueda distribuirse uniformemente y 4) comprobar que está “bien hecho” [75].

2. Recomendaciones para la población sensibilizada

- 1) Evitar la ingesta de pescado crudo o cocinado de forma inadecuada en el microondas o a la plancha.
- 2) Evitar el consumo de pescado poco procesado: salazonado, ahumado, en vinagre, escabechado, marinado, carpaccio, ceviche, preparaciones culinarias orientales, etc.
- 3) Consumir siempre pescado que haya sido congelado (–20°C durante una semana en frigoríficos de 3 o 4 estrellas). Es más adecuado el congelado en alta mar ya que se eviscera inmediatamente tras la captura (la posibilidad de migración al músculo es menor), el proceso de congelación es muy rápido y la temperatura de almacenamiento muy baja.
- 4) Evitar consumir la región hipoaxial (ventresca o ijada) y pescados pequeños enteros
- 5) Consumir preferentemente colas de pescados de tamaño grande y pescado de agua dulce o marino cultivado.
- 6) En caso de consumir pescado fuera del hogar, advertir que se es alérgico a *Anisakis* y asegurarse de que el pescado reúne garantías suficientes de ausencia de contaminación por el parásito.

Legislación

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 alimentos de origen animal. DO L 226 de 25/06/2004, págs. 22-82.

Reglamento (CE) nº 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. DO L 226 de 25/06/2004, págs.83-127.

Decisión 93/140/CEE: Decisión de la Comisión, de 19.01.93, por la que se establecen las modalidades de control visual para detectar parásitos en los productos de la pesca. DO L 056 de 09/03/1993, pág. 42.

Otros documentos de interés

Anónimo. 1998. Opinion of the Scientific Committee on veterinary measures relating to public health - allergic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens and evaluation of the possible risk to human health - 27 april 1998.

Referencias bibliográficas

1. Kassai, T., Cordero del Campillo, M., Euzeby J., Gaafar, S., Hiepe, T., Himonas, CA. Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). *Vet Parasitol* 1988; 29: 299-326.
2. Pereira Bueno, J. M. Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisakiosis. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. Dirección General de Salud Pública: 1992, 64 pp.
3. Audicana, M. Controversia en el diagnóstico de alergia a *Anisakis*: Diagnóstico clínico y manejo. *Alergol Inmunol Clin* 2001; 16: 39-56.
4. Sugane, K., Shu-Han, S., Matsuura, T. Radiolabelling of the excretory-secretory and somatic antigens of *Anisakis simplex* larvae. *J Helminthol* 1982; 66: 305-309.
5. Iglesias R., Leiro J., Ubeira, F. M., Santamarina, M. T., Sanmartín M. L. *Anisakis simplex*: antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. *Parasite Immunol* 1993; 15: 243-250.
6. Sakanari, J. A., MCKerrow, J. H. Identification of the secreted neutral proteases from *Anisakis simplex*. *J Parasitol* 1990; 76: 625-630.
7. Baeza, M.L., Zubeldia, J.M., Rubio, M. *Anisakis simplex* allergy. *ACI International* 2001; 13: 242-249.
8. Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F. M., Santamarina, M. T., Sanmartín, M. L. *Anisakis simplex*: stage-specific antigens recognized by mice. *J Helminthol* 1995; 69: 319-324.
9. Audicana, M.T., Fernández, L., Muñoz, D. Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96:558-60.
10. Del Pozo, M. D., Moneo, I., Fernández de Corres, L., Audicana, M. T., Muñoz, D., Fernández, E., Navarro, J. A., García, M. Laboratory determinations in *Anisakis simplex* allergy. *J Allergy Clin Immunol*1996; 97:977-984.
11. Alonso, A., Daschner, A., Moreno Ancillo, A. Anaphylaxis with *Anisakis simplex* in gastric mucosa. *N Eng J Med*1997; 337:350-351.
12. López-Serrano, M. C., Alonso-Gómez, A., Moreno, A., Daschner, A., Suárez, J. Anisakiasis gastro-alérgica: hipersensibilidad inmediata debida a parasitación por *Anisakis simplex*. *Alergol Inmunol Clin* 2000; 15: 230-236.
13. Sastre, J., Llunch-Bernal, M., Fernández, E., Marañón, F., Quirce, S., Arrieta, I. Estudio de provocación oral doble ciego controlada con placebo con larvas de *Anisakis simplex* liofilizadas. *Alergol Inmunol Clin* 2000; 15: 225-229.
14. Lorenzo Iglesias, S. *Anisakis* y alergia. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología y Parasitología. 2001.
15. Ubeira, F. M. *et al*. Anisakuiosis y alergia. Un estudio seroepidemiológico en la Comunidad Autónoma Gallega. Xunta de Galicia. Documentos Técnicos de Saúde Pública Serie B núm. 24. 2000.
16. International Union of Immunological Societies, Allergen Nomenclature Sub-Committee. Allergen Nomenclature. List of allergens as of September 01, 2004. [<http://www.allergen.org/List.htm>]
17. Moneo, I., Caballero, M. L., Gomez, F., Ortega, E., Alonso, M. J. Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 177-182.
18. Gomez-Aguado, F., Picazo, A., Caballero, M. L., Moneo, I., Asturias, J. A., Corcuera, M. J., Casado, I., Alonso, M. J. Ultrastructural localization of Ani s 1, a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol Res* 2003; 89:379-380.
19. Pérez-Pérez J, Fernández-Caldas E, Marañón F, Sastre J, Vernal ML, Rodríguez Bedate CA. Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123:120-129.
20. Asturias, J. A., Eraso, E., Moneo, I., Martínez, A. Is tropomyosin an allergen in *Anisakis*? *Allergy* 2000; 55: 898-899.
21. Asturias, J. A., Eraso, E., Martínez, A. Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform. *Mol Biochem Parasitol* 2000;108:263-267.

22. Caballero, M. L., Moneo, I. Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitol Res* 2004; 93:248-251.
23. Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Mora, C., Moreno Ancillo, A., Villanueva, R., López-Serrano, M. C. Gastroallergic anisakiasis with masive parasitism *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1997; 12: 370-372.
24. Noboro, K., Hiroshi, I. A case of abdominal syndrome caused by the presence of a large number of *Anisakis* larvae. *Int J Parasitol* 1992; 22: 251-253.
25. Pérez Millán, A., Martín Lorente, J. L., Pérez Álvarez, López Morante, A., Sáez-Rogueta, F., Busteros, J. I. Ulcera gástrica secundaria a infección por *Anisakis*. *Revista de la ACAD* 1998; 14: 25-27.
26. Romero Ramírez, J. A., Martínez Conde, A. E., Olivares Galdeano, U., Sancha Pérez, A., López de Torre, J., Barros Ingerto, J. *et al.* Anisakiasis gástrica diagnosticada por endoscopia. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 20: 306-308.
27. Louredo-Méndez, A., Acedo de la Rosa, F., Arribas de Paz, V., Sanz Ortega, E., Bernardo Quirós, L., Goyanes Martínez, A. Anisakidosis del colon como causa de abdomen agudo. *Rev Esp Enf Digest* 1997; 89: 403-406.
28. Shirahama, M., Koga, T., Ishibashi, H., Uchida, S., Ohta, Y., Shimoda, Y. Intestinal anisakiasis: US in diagnosis. *Radiology* 1992;185: 789-793.
29. Tadamori, S., Shigeyuki, I., Hisato, H., Tomonori, A., Noriyoshi, B., Takashi, B. A case of gastric submucosal tumor due to *Anisakis* granuloma. *Jpn J Med Ultrasonics* 1992; 19: 38-43.
30. Domínguez Ortega, J., Cimarra, M., Sevilla, M., Alonso Llamazares, A., Moneo, I., Robledo Echaren, T., Martínez-Cócerca, C. *Anisakis simplex*: a cause of intestinal pseudo-obstruction. *Rev Esp Enferm Dig* 2000; 92:132-139.
31. Del Olmo Escribano, M., Cozar Ibañez, A., Martínez de Victoria, J. M., Ureñas Tirao, C. Anisakiasis a nivel ileal. *Rev Esp Enferm Dig* 1998; 90: 120-123.
32. Rushovich, A. M., Randall, E. L., Caprini, J. A., Westerfelder, G. O. Omental anisakiasis: a rare mimic of acute appendicitis. *Am J Clin Pathol* 1983; 80: 517-520.
33. Matsuoka, H., Nakama, T., Kisanuti, H., Uno, H., Tachibana, N., Tsubouchi, H., Horii, Y., Nava, Y. A case of serologically diagnosed pulmonary anisakiasis with pleural efusión and multiple lesions. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 819-822.
34. Moreno-Ancillo, A., Caballero, M. T., Cabañas, R., Contreras, J., Martín-Barroso, J. A., Barranco, P., López-Serrano, M. C. Allergic reactions to *Anisakis simplex* parasitizing seafood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 79: 246-250.
35. Mendizabal-Basagoiti, L. Hipersensitivity to *Anisakis simplex*: a propos of 36 cases. *Allerg Immunol (Paris)* 1999; 31: 15-17.
36. Armentia, A., Lombardero, M., Callejo, A., Martín Santos, J. M., Gil, F. J., Vega, J., Arranz, M. L., Martínez, C. Occupational asthma by *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 831-834.
37. Añibarro, B., Seoane, F. J. Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol*. 1998; 102: 331-332.
38. Carretero Añibarro, P., Blanco Carmona, J., García González, F., Marcos Durantez, M., Alonso Gil, L., Garces Sotillas, M, *et al.* Protein contact dermatitis caused by *Anisakis simplex*. *Contact Dermatitis* 1997; 37: 247.
39. Cuende, E. Rheumatic manifestations in the course of anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 303-304.
40. López-Serrano, M. C., Alonso Gómez, A., Daschner, A., Moreno-Ancillo, A., Suárez de Parga, J. M., Caballero, M. T., Barranco, P., Cabañas, R. Gastroallergic anisakiasis: Findings in 22 patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 503-506.
41. Domínguez Ortega, J., Martínez-Cócerca, C. Guía de actuación en patología producida por *Anisakis*. *Alergol e Inmunol Clín* 2000; 15: 267-272.
42. Kasuya, S., Hamano, H., Izumi, S. Mackerel induced urticaria and *Anisakis*. *Lancet* 1990; 335: 665.
43. Audicana, M. T., Fernández de Corres, L., Muñoz, D. *Anisakis simplex* a new sea-food allergen. *Allergy* 1995; 50 (sup 26): 127.

44. Sastre, J., Lluch-Bernal, M., Quirce, S., Arrieta, I., Lahoz, C., Del Amo, A., Fernández-Caldas, E., Marañón, F. A double-blind, placebo-controlled oral challenge study with lyophilized larvae and antigen of the fish parasite *Anisakis simplex*. *Allergy* 2000; 55: 560-564.
45. Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Caballero, M. T., Suárez de Parga, M. L., López-Serrano, M. C. Usefulness of early serial measurement of specific and total immunoglobulin E in the diagnosis of gastro-allergic anisakiasis. *Clin Exp Allergy* 1998; 29: 1260-1264.
46. Pascual, C., Muñoz-Pereira, M., Martín Esteban, M. Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis*, German cockroach, and chironomids. *Allergy* 1997; 52: 514-520.
47. Johansson, E., Apponno, M., Lundberg, M., van Hage-Hamsten, M. Allergenic cross-reactivity between the nematode *Anisakis simplex* and the dust mites *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy* 2001; 56: 660-666.
48. Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F. M., Santamarina, M. T., Navarrete, I., Sanmartín, M. L. Antigenic cross-reactivity in mice between third stage larvae of *Anisakis simplex* and the other nematodes. *Parasitol Res* 1996; 82: 378-381.
49. Fernández Caldas, E., Quirce, S., Marañón, F., Díez-Gómez, M. L., Gijón-Botella, H., López-Roman, R. Allergenic cross-reactivity between third stage larvae of *Hysterothylacium aduncum* and *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 554-555.
50. Lorenzo, S., Iglesias, R., Paniagua, E., Leiro, J., Ubeira, F. M. Analysis of the antigenicity in mice of biotinyl enzymes from *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitol Res* 1999; 85: 441-445.
51. Moneo, I., Audicana, M. T., Alday, E., Curiel, G., del Pozo, M. D., García, M. Periodate treatment of *Anisakis simplex* allergens. *Allergy* 1997; 52: 565-569.
52. Lorenzo, S., Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F. M. Usefulness of currently available methods for the diagnosis of *Anisakis simplex* allergy. *Allergy* 2000; 55: 627-633.
53. Valls, A., Pascual, C. Y., Pereira, M. J., Belver, M. T., Daschner, A., Lopez-Serrano, M.C., Cuellar, C., Martín Esteban, M. Cross-reactivity of *Anisakis* full body allergen and the relationship with secretor-excretory allergen. *Allergy* 2002; 57(sup 73): 104. (Abstract).
54. Arenal, J. J., Marcos, J. L., Borrego, M. H., Bowakin, W., Castro, J., Blanco, J. I. Anisakiasis como causa de apendicitis aguda y cuadro reumatológico: primer caso en la literatura médica. *Rev Esp Enf Digest* 1991; 79: 355-358.
55. Adroher FJ, Valero A, Ruiz-Valero J, Iglesias L. Larval anisakids (Nematoda: *Ascaridoidea*) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada, Spain. *Parasitol Res* 1996; 82: 319-22.
56. WHO 1989. Report of WHO Consultation on Public Health Aspects of Seafood-Borne Diseases. WHO/CDS/VPH/90.86.
57. Abollo, E., Gestal, C., Pascual, S. *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitol Res* 2001; 87:492-499.
58. Huss, H.H., Ababouch, L., Gram, L. Assessment and management of seafood safety and quality. FAO fisheries technical paper 444. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome 2003. Disponible en:
59. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health - Allergic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens and evaluation of the possible risk to human health. 27 April 1998. Disponible en: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out05_en.htm
60. Jemmi, T., Schmitt, M., Rippen, T.E. Safe handling of seafood. In: Safe handling of foods. Farber JM, Todd EC, eds. New York: Marcel Dekker Inc, 2000: 105-165.
61. FDA. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide. 3rd edition. US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington DC, USA, 2001. Disponible en:
62. Anónimo. Reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el

que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. DO L 226 de 25/06/2004, págs. 22-82.

63. Anónimo. Decisión de la Comisión, de 19.01.93, por la que se establecen las modalidades de control visual para detectar parásitos en los productos de la pesca. 93/140/CEE. DO L 056 de 09/03/1993, pág. 42.
64. ICMSF. Microorganisms in Foods 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens. Blackie Academic & Professional. London, 1996.
65. Dong, F. M., Ton, M. N., Adams, A.M., MacKenzie, A. P., Wekell, M. M. Survival of *Anisakis simplex* in freeze-processed Arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). Institute of Food Technologists. 2000 IFT Annual Meeting, June 10-14, Dallas, TX. Abstract #51A-35. Disponible
66. Wharton, D. A, Alders, O. 2002. The response of *Anisakis* larvae to freezing. J Helminthol 2002; 76: 363-368.
67. Howgate, P. 1998. Review of the public health safety of products from aquaculture. Int J Food Sci Technology 1998; 33: 99-125.
68. FDA. Processing parameters needed to control pathogens in cold smoked fish. Potential hazards in cold-smoked fish: parasites. US Food and Drug Administration, 2001. Disponible en
69. Molina-Garcia, A. D., Sanz, P. D. *Anisakis simplex* larva killed by high-hydrostatic-pressure processing. J Food Prot 2002; 65: 383-388.
70. Alonso-Gomez, A., Moreno-Ancillo, A., Lopez-Serrano, M. C., Suarez-de-Parga, J. M., Daschner, A., Caballero, M. T., Barranco, P., Cabanas, R. *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract. Parasitol Res. 2004; 93:378-384.
71. Fernandez de Corres, L., Audicana, M., Del Pozo, M. D., Munoz, D., Fernandez, E., Navarro, J. A., Garcia, M., Diez, J. *Anisakis simplex* induces not only anisakiasis: report on 28 cases of allergy caused by this nematode. J Investig Allergol Clin Immunol 1996; 6:315-319.
72. Falcao, H., Lunet, N., Neves, E., Barros, H. Do only live larvae cause *Anisakis simplex* sensitization? Allergy. 2002 Jan;57(1):44.
73. Trujillo, M. J., Rodriguez, A., Gracia Bara, M. T., Matheu, V., Herrero, T., Rubio, M., Zubeldia, J. M., Baeza, M. L. Dietary recommendations for patients allergic to *Anisakis simplex*. Allergol Immunopathol (Madr) 2002; 30:311-314.
74. Valls, A., Pascual, C. Y., Martín Esteban, M., *Anisakis* y anisakiosis. Allergol Immunopathol (Madr) 2003; 31: 348-355.
75. USDA. Cooking safely in the microwave oven. Food Safety and Inspection Service, 2000. Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/oa/pubs/fact_microwave.PDF

Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Dirección Ejecutiva, en relación con la aplicación de altas presiones en carne y productos cárnicos.

Núm. Referencia: AESA-2003-007

Documento aprobado por el Comité Científico en sesión plenaria el 12 de Mayo de 2004

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver (Presidente). Juan José Badiola (Vicepresidente). Arturo Anadón Navarro, Margarita Arboix Arzo, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Francesc Centrich Escarpenter, José Luis García López, M^o Luisa García López, Manuela Juárez Iglesias, Manuel Martín Esteban, Juan Antonio Ordóñez Pereda, Andrés Otero Carballeira, Fernando Rodríguez Artalejo, Elías Rodríguez Ferri, José Manuel Sánchez Vizcaino Rodríguez, Vicente Sanchís Almenar, Gregorio Varela Moreiras, Gonzalo Zurera Cosano.

Grupo de Trabajo

Juan A. Ordóñez Pereda (coordinador)
Gonzalo Zurera Cosano
Albert Bosch Navarro
Andrés Otero Carballeira
Buenaventura Guamis López (experto externo)

Resumen

La aplicación de altas presiones hidrostáticas es un proceso físico no térmico que se puede utilizar para desactivar ciertos microorganismos presentes en los alimentos para lo que se utilizan habitualmente presiones comprendidas entre 300 y 700 MPa. Es una tecnología que data de finales del siglo XIX aunque puede considerarse que, desde un punto de vista comercial, su estudio, desarrollo y aplicación a los alimentos comenzó hace unos cuatro lustros, existiendo en la actualidad una abundante bibliografía acerca del efecto de las altas presiones en la viabilidad microbiana y en las propiedades funcionales de los componentes de los alimentos. Los microorganismos pueden ordenarse en relación con su manorresistencia, de menos a más resistentes, en mohos y levaduras → bacterias Gram negativas → virus con envoltura → hongos → bacterias Gram positivas → virus desnudos → esporas bacterianas. Aparte de la manorresistencia intrínseca de cada microorganismo, son muchos los agentes y factores que influyen en la letalidad de las altas presiones. Los más importantes quizás sean el nivel de presurización, la temperatura y el pH aunque en un segundo lugar se pueden colocar otros muchos, como tiempo de presurización, ingredientes, agentes antimicrobianos (bacteriocinas, antisépticos, etc.) presentes, etc.

Una de las aplicaciones potenciales del tratamiento de los alimentos con altas presiones es la posibilidad de destruir microorganismos alterantes y patógenos para, respectivamente, ampliar su vida útil o conseguir un producto final seguro. En primer lugar, hay que apuntar que tanto desde el punto de vista tecnológico como del sanitario cabe decir que, debido a la gran manorresistencia que presentan las bacterias esporuladas, las altas presiones, en el estado actual de desarrollo, no parece que puedan aplicarse para conseguir la esterilidad comercial de los alimentos. La aplicación de altas pre-

siones queda, por tanto, restringida a la higienización (equivalente a pasteurización) de los alimentos, lo que implica que los microorganismos a tener en cuenta principalmente son los patógenos no esporulados. No cabe duda que, al tiempo, se reduciría la carga de microorganismos alterantes, en especial la microbiota aerobia Gram negativa, con lo que se conseguiría un aumento de la vida útil del producto final refrigerado. Se plantea, en definitiva, analizar, a la luz de los conocimientos actuales, si el tratamiento de la carne y productos cárnicos con altas presiones es apropiado para conseguir una eficaz protección del consumidor (en relación con los riesgos de origen microbiano), en las condiciones actuales de la sociedad europea y determinar en qué circunstancias se alcanzarán los correspondientes objetivos de seguridad alimentaria (FSO).

Teniendo en cuenta la manorresistencia de los diferentes microorganismos de interés sanitario descrita en distintas publicaciones puede concluirse que los microorganismos que alcanzan mayor relevancia son: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. De estos, se descarta *Staph. aureus* como microorganismo "diana" debido a que su crecimiento es fácil de controlar en productos refrigerados.

De acuerdo con las dosis infectivas de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, la gravedad de la enfermedad que ocasionan, los datos acerca de los brotes que han ocurrido, los criterios microbiológicos propuestos y las características culturales de cada bacteria, se ha concluido que para conseguir, en cada caso, el correspondiente FSO en productos cárnicos crudos y en productos RTE se requeriría un tratamiento que logre, respectivamente, 4,4 y 2,4 reducciones decimales en el caso de *E. coli* O157:H7 y de 6 y 4 reducciones decimales en el de *L. monocytogenes*.

A la vista, por una parte, de la resistencia en matrices alimentarias de *E. coli* O157:H7 frente a la acción letal de las altas presiones y, por otra, el FSO ($-2,4 \log_{10}$ u.f.c. g^{-1}) que se requiere alcanzar (equivalente a 4,4 reducciones decimales con los niveles de contaminación que pueden esperarse en productos crudos) para conseguir, desde un punto de vista microbiológico, un producto cárnico seguro, puede concluirse que se necesitarían tratamientos superiores a 600 MPa en los productos cárnicos crudos. En el caso de productos RTE sería suficiente un tratamiento de 300 - 400 MPa, dado que en este caso el tratamiento tendría que reducir la tasa de *E. coli* O157:H7 sólo 2,4D. Los valores correspondientes para *L. monocytogenes*, con un FSO de 10^2 u.f.c. g^{-1} , son presurizaciones superiores a 600 MPa (reducción de 6D) para productos crudos y de 500 MPa (reducción de 4D) para los RTE.

Es difícil, pues, conseguir los FSO para ambas bacterias en un producto crudo. Sin embargo, las altas presiones pueden ser muy útiles para librar al mercado productos RTE seguros.

Palabras clave

Altas presiones, carne, productos cárnicos, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, seguridad alimentaria.

1. Desarrollo y fundamentos de las altas presiones

Las altas presiones isostáticas se conocen desde finales del siglo XIX (Hite, 1899) y principios del siglo XX (Hite y col., 1914; Larson y col., 1918). Ya en ese tiempo se informó que las bacterias vegetativas se podrían inactivar tratándolas a presiones de 400 a 600 MPa. Sin embargo, apenas progresaron las investigaciones durante un largo periodo de tiempo porque en esa época no era posible la construcción de equipos fiables y hubo que esperar al desarrollo de la cerámica industrial que utilizó estos equipos para la compactación de materiales (Sale y col., 1979) y para fabricar equipos que posteriormente se aplicaron a los alimentos. Debido, por una parte, a la demanda de alimentos mínimamente procesados, exentos de aditivos y microbiológicamente seguros y, por otra, al gran desarrollo de los aspectos ingenieriles de los equipos de altas presiones, sobre todo a partir de 1982, se reactivaron los estudios con los trabajos realizados por el grupo de Knorr en la Universidad de Delaware (Knorr, 2000) y en 1989 la Universidad de Kyoto y el Ministerio de Agricultura, Bosques y Pesquerías de Japón desarrollaron un proyecto coordinado para la construcción de un equipo de altas presiones para su uso en la industria alimentaria (Johnston, 1995), apareciendo en el mercado japonés alrededor de 1990 ciertos productos (mermeladas, zumos de frutas) tratados por altas presiones (Ledward, 1995). En Europa a partir del Congreso celebrado en "La Grand Motte" en Francia, en 1992 se constituyeron los primeros grupos que comenzaron a investigar esta tecnología en los que fueron incluidos dos grupos españoles (el CER Planta de Tecnología dels Aliments de la Universidad Autónoma de Barcelona en 1992 y el Instituto del Frío del CSIC en 1994). Desde esas fechas, y sobre todo en la última década, se han publicado innumerables trabajos y hoy se conoce razonablemente bien la manorresistencia de los microorganismos de mayor interés en Tecnología de los Alimentos, incluidos los productores de infecciones e intoxicaciones alimentarias aunque existen algunas lagunas acerca de la cinética de inactivación y los mecanismos íntimos de la acción letal de las altas presiones.

El término "altas presiones" es confuso a no ser que se relacione con alguna presión conocida, por ejemplo, en la zona baja, la atmosférica (0,1 MPa) o, en las altas, la profundidad donde reposa el "Prestige" (alrededor de 30 MPa) o las simas oceánicas más profundas (aprox. 100 MPa). Estas son muy bajas si se tiene en cuenta los 5 – 6 GPa que se utilizan en la industria del diamante artificial (Crossland, 1995) o algo menos si se comparan con las que pueden aplicarse a los alimentos cuyo intervalo está comprendido entre 100 MPa y 1000 MPa (Ledward, 1995) aunque en la industria alimentaria las altas presiones que se utilizan habitualmente para la higienización de alimentos se sitúan en el intervalo de 300 – 1000 MPa.

Los efectos de las altas presiones descansan en dos principios; uno el de Chatelier que indica que cualquier fenómeno que va acompañado de una disminución de volumen se verá potenciado cuando se aplica presión o, en otras palabras, cuando se aplica una fuerza a un sistema, éste responde tratando de amortiguar la fuerza. El otro, el principio de Pascal, que predice que la presión aplicada a un fluido en un punto se transmite de forma instantánea y homogénea a los restantes, independientemente del tamaño y la geometría del medio; es lo que se conoce como presión isostática.

Los fundamentos, el desarrollo, el equipo y los efectos de las altas presiones en los alimentos y sus componentes han quedado descritos en numerosas revisiones a las que se remite al lector para

ampliar conocimientos acerca de esta tecnología (Ledward y col., 1995; Tewari y col., 1999; Farkas y Hoover, 2000; Barbosa-Cánovas y Gould, 2000; Yuste y col., 2001; Palou y col., 2002; Balasubramaniam, 2003).

2. Cinética de desactivación microbiana por las altas presiones, mecanismo de acción y factores de que depende

Los primeros experimentos para dilucidar la cinética de destrucción de los microorganismos por las altas presiones se hicieron imitando los modelos muy bien conocidos de los tratamientos térmicos, es decir, representando, a presión constante, el logaritmo de supervivientes frente al tiempo de tratamiento. Es así como puede verse en numerosas publicaciones, donde se ofrecen los respectivos valores D (tiempos de reducción decimal). Sin embargo, algunos autores admiten que la naturaleza de la cinética de desactivación por las altas presiones difiere de la de la muerte térmica y otros tipos de tratamientos (Earnshaw, 1995; Isaacs y col., 1995), pudiendo variar incluso entre cepas de la misma especie (Simpson y Gilmour, 1997a; Tay y col., 2002) y de la presión que se aplique (Simpson y Gilmour, 1997a). En los tratamientos térmicos se asume que la muerte de microorganismos es log-lineal con el tiempo. Éste ha sido el enfoque aplicado durante muchos años en la industria y ha probado ser satisfactorio. Sin embargo, se han encontrado desviaciones a esta linealidad, lo que ha provocado que actualmente se estén revisando de nuevo. En los tratamientos de alta presión, estas desviaciones suelen ser más comunes y se caracterizan por un pronunciado "efecto de cola". Por lo tanto, las tablas clásicas de t-T (tiempo-temperatura) se substituyen por tablas P-t-T (presión-tiempo-temperatura), considerando además el tiempo de descompresión y el tiempo necesario para alcanzar la presión deseada. La cinética de desactivación puede presentar variaciones significativas entre distintas cepas de una misma especie y se puede considerar por supuesto que las curvas son diferentes a las distintas presiones aplicadas. Además, hay que añadir que las altas presiones producen daños subletales en alguna fracción de la población microbiana (Pettersen y col., 1995) que, tras un periodo de adaptación, puede recuperarse y multiplicarse de nuevo en el alimento (Smelt, 1998; Mussa y col., 1999; Yuste y col., 1999), lo que adquiere gran importancia cuando se estima la eficacia del tratamiento.

Las gráficas de supervivencia que se han obtenido en los distintos estudios son de diversa naturaleza.

- En unas, se advierte una marcada reducción, unas veces siguiendo una cinética de primer orden y otras no, del número de viables en los primeros minutos de tratamientos para, después, pasar a otro tramo con una pendiente menor. Así se ha observado, por ejemplo, para *Staphylococcus carnosus* (Earnshaw, 1995). Se ha explicado asumiendo la existencia de una subpoblación más sensible que se destruiría antes que una segunda subpoblación más manorresistente.
- En algunas, se observa un "hombro" inicial para después seguir un curso logarítmico o *cuasi* logarítmico. Este comportamiento se ha detectado en estudios con *Listeria monocytogenes* (Ritz y col., 2000) que se podría explicar, al igual que en los tratamientos térmicos, por la formación de agregados celulares y por la protección por contacto entre célula y célula (Cerf, 1977).
- En otras, el modelo de destrucción que muestra la gráfica se desvía de la linealidad y en el tramo final se observan "colas" que demuestran una subpoblación microbiana con una marcada resis-

tencia a las altas presiones, lo que sugiere que la población de microorganismos producida por un cultivo es heterogénea (Ritz y col., 2000). Mossel y col. (1995) explicaron el fenómeno indicando que un determinado número de células vivas quedaba protegido por células que ya habían muerto o por los productos de su destrucción pero esta hipótesis no es probable porque va contra la ley de Pascal que predice que la presión hidrostática es isostática, además del efecto que produce el agua necesaria como fluido transmisor. Otra hipótesis que se ha ofrecido para explicar la desviación de la linealidad ha sido que el suceso ocurre en dos fases pasando a través de una etapa intermedia (Heinz y Knorr, 1996; Knorr, 2000). Casi todos los autores han observado estas "colas" con cualesquiera de las especies microbianas que han utilizado en sus estudios. Por lo tanto, hay que considerarlas como un fenómeno habitual en la cinética de destrucción microbiana por las altas presiones. Hay que apuntar al respecto que actualmente también se recogen en estudios rigurosos sobre tratamientos térmicos.

La existencia de una población residual de una mayor resistencia a las altas presiones, que es lo que realmente indican las citadas "colas", tiene implicaciones prácticas de gran trascendencia porque los habituales parámetros D y z que con tanto éxito se han utilizado para predecir la población que sobrevive a los procesos térmicos (pasteurización y esterilización) no se pueden aplicar en el caso de las altas presiones. Algunos autores (McMeekin y col., 1993) han estudiado mediante métodos de los mínimos cuadrados la posibilidad de ajuste a otros modelos, concluyendo que el mejor se correspondía con una compleja ecuación logística que, en realidad, no ha trascendido porque era específica para la destrucción de *Staphylococcus carnosus* a 500 MPa en caldo nutritivo (Earnshaw, 1995). Sería necesario comprobar si la destrucción de otros microorganismos obedece a un modelo similar.

Aunque los mecanismos íntimos de la acción letal de las altas presiones no se conocen con exactitud, se considera de forma general que es el resultado de diferentes fenómenos simultáneos que conllevan lesiones en la membrana plasmática ocasionando la desorganización de la misma (Hoover y col., 1989; Mackey y col., 1994) que cursa normalmente con la muerte aunque se pueden producir también lesiones subletales que, dependiendo de las condiciones ambientales del microorganismo, pueden restablecerse. Sin embargo, el daño ocasionado en la membrana puede variar entre relativamente bajas y altas presiones y su relación con la muerte celular puede diferir entre especies y fases de crecimiento (Pagán y Mackey, 2000). Asimismo, existen algunas evidencias (Sonoike y col., 1992; Hashizume y col., 1996) que indican que algunas enzimas microbianas pueden ser la "diana" de la desactivación por las altas presiones. Las enzimas de las membranas que participan en el sistema de transporte son unas firmes candidatas a verse afectadas por las altas presiones, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de la levadura de panadería que fue inactivada por presiones de 100 - 200 MPa (Jaenicke, 1991). Lo mismo se podría decir de las enzimas encargadas del reflujo de protones, como la ATPasa F_0F_1 (Wouters y col., 1998).

El grado de destrucción microbiana por las altas presiones depende, en primer lugar, del tipo de microorganismo que se trate (Earnshaw, 1995). En relación con la manorresistencia de los microorganismos, pueden ordenarse, de menos a más resistentes, como mohos y levaduras → bacterias Gram negativas → virus con envoltura → hongos → bacterias Gram positivas → virus desnudos → esporas

bacterianas. Se ha postulado que como la estructura de la membrana plasmática es más compleja en las Gram negativas, la célula bacteriana sería más sensible a los agentes externos, entre ellos la presurización (Shigehisa y col., 1991). Los mohos y levaduras se desactivan a presiones de 200 – 300 MPa (Cheftel, 1995); las Gram negativas se destruyen generalmente entre 300 – 400 MPa aunque hay alguna bacteria Gram negativa con gran interés en la industria alimentaria que presenta una manorresistencia anormalmente muy elevada, tal es el caso de *Escherichia coli* O157-H7, por ejemplo, en leche UHT (Patterson y col., 1995a). No obstante, hay que advertir acerca de la manorresistencia de Gram positivas y negativas que últimamente se ha detectado un solapamiento considerable entre ambos grupos de formas vegetativas (McClements y col., 2001). Entre las Gram positivas merece especial mención las especies del género *Staphylococcus*, que pueden sobrevivir tras la aplicación de presiones de 500 MPa durante 60 minutos (Earnshaw, 1995). Entre estas especies se encuentra *Staph. aureus*, una bacteria patógena que tras un tratamiento de 600 MPa durante 10 - 30 minutos en muestras de carne o leche inoculadas sólo se reduce su número entre 2 y 6 ciclos logarítmicos (Shigeisa y col., 1991; Patterson y col., 1995a; Gervilla y col. 1997). Las bacterias esporuladas son bastante más manorresistentes, se requieren presiones del orden de 1000 MPa, o más, para lograr su destrucción (Earnshaw y col., 1995; Smelt, 1998) aunque puede haber bastantes diferencias entre cepas (Nakayama y col., 1996). *Clostridium botulinum* (Rovere y col., 1998; Reddy y col., 1999) se ha mostrado extremadamente manorresistente (no se observó ninguna reducción del número de esporas) con tratamientos de 5 minutos a 827 MPa a temperaturas inferiores a 35°C y se necesitaron presurizaciones a 50 – 55°C para lograr, a aquella presión, 5 reducciones logarítmicas (Reddy y col., 1999). Incluso se ha informado que, a temperatura ambiente, se han necesitado presiones de 1500 MPa para lograr tan sólo 1,5 reducciones decimales de esporas de *Clostridium sporogenes* en caldo de zanahoria (Rovere, 1996). Esta gran manorresistencia se ha relacionado con el estado deshidratado, o incluso potencialmente vítreo, del protoplasto de las esporas que le confiere resistencia a sustancias químicas, agentes físicos como el calor y las radiaciones ionizantes. Este estado, evidentemente, se mantiene durante la aplicación de altas presiones y parece ser que le confiere la extrema manorresistencia (Gould, 1995). La gran manorresistencia de las bacterias esporuladas parece que es de carácter general en todas las especies. Sin embargo, se ha informado casos en que se han desactivado a presiones mucho más bajas, del orden de 50 – 300 MPa (Sale y col., 1970), lo que se ha atribuido a una activación de la germinación por las altas presiones seguido de la muerte de las células vegetativas (Smelt y col., 1998), en algunos casos también combinadas con nisina (Capellas y col., 2000). La misma explicación se ha utilizado para justificar la enorme destrucción (más de 8 unidades logarítmicas) de esporas de *Bacillus subtilis* cuando se sometieron a tratamientos alternativos de 1 minuto a 60 y 500 MPa (Sojka y Ludwing, 1997).

Los virus son agentes infecciosos compuestos bien exclusivamente de ácidos nucleicos y proteínas (virus desnudos), y en algunos casos con la presencia adicional de lípidos (virus con envoltura). La inmensa mayoría de virus causantes de infecciones alimentarias son virus desnudos, y entre éstos cabe destacar al virus de la hepatitis A, responsable a nivel mundial de la mitad de todas las hepatitis diagnosticadas, rotavirus, causantes cada año de alrededor de un millón de muertes infantiles en todo el mundo, y los norovirus que están implicados en el 90% de las gastroenteritis causadas por alimentos.

Se han estudiado los efectos de presiones hidrostáticas elevadas en varias cepas de virus (Oliveira y col., 1999). La alta presión desnaturaliza las proteínas de las cápsides víricas. Dependiendo de la presión ejercida, esta desnaturalización puede ser reversible o irreversible (Silva and Weber). Se ha empleado alta presión para inactivar el virus de la inmunodeficiencia humana (Jurkiewicz y col., 1995), el virus de la estomatitis vesicular (Silva y col., 1992) o rotavirus bovinos y de simio (Pontes y col., 1997). Se ha podido comprobar que las altas presiones son capaces de inactivar los virus sin alterar sus propiedades antigénicas, lo cual abre también prometedoras vías de preparación de vacunas víricas inactivadas (Balny y col., 1992; Basset y col., 1956). En la industria alimentaria también se ha propuesto (Kingsley y col., 2002) el uso de altas presiones (de alrededor de 450 MPa) para proporcionar un mayor nivel de seguridad al marisco, frecuentemente involucrado en brotes de gastroenteritis o hepatitis de origen vírico.

Aparte de las diferencias entre especies y cepas de microorganismos que se han mencionado, uno de los factores que adquiere importancia es la fase de crecimiento. En general, las células en fase de crecimiento exponencial son más sensibles a las altas presiones que en fase estacionaria (Patterson y col., 1995a; Isaacs y col., 1995; Benito y col., 1999; Karatzas y col., 2002). Por ejemplo, se ha observado en *E. coli* que un tratamiento de 200 MPa durante seis minutos no consigue reducir el número de células bacterianas en un ciclo logarítmico si aquéllas están en fase estacionaria pero se logra una reducción superior a seis ciclos si se encuentran en fase exponencial (Isaacs y col., 1995) aunque en esta misma especie se ha observado que en fase estacionaria hay cepas mucho más resistentes que otras, pero en fase exponencial todas ellas muestran la misma sensibilidad a las altas presiones (Pagan y Mackey, 2000). Existen datos que apuntan a que las células bacterianas son más sensibles a la presión cuando la membrana es rígida y más resistente cuando es fluida (Smelt y col., 1994), lo que quizás puede estar relacionado con la acumulación de componentes celulares, como proteínas, en la fase estacionaria que podría minimizar los efectos de las altas presiones (Isaacs y col., 1995). Esta hipótesis puede apoyarse en el efecto protector que se ha observado cuando el medio de presurización que se ha empleado ha sido algún alimento (Styles y col., 1991) o se le ha adicionado algún componente normalmente presente en alimentos, como albúmina o glucosa (Simpson y Gilmour, 1997b).

Son numerosos los agentes y factores que afectan la destrucción de los microorganismos por altas presiones; entre ellos, se encuentran: temperatura, tiempo y presión aplicada, la fase de crecimiento, temperatura de formación de esporas, la cepa, presencia o ausencia de sustancias antimicrobianas y la matriz alimentaria implicada. Uno de los factores más importantes es el medio en que se realiza el tratamiento. La tabla 1 (apéndice I) muestra claramente que, con cualquier especie, cuando las altas presiones se aplican directamente en el alimento, las bacterias presentes son mucho más manorresistentes, incluso en sistemas modelos donde se ha adicionado compuestos que habitualmente forman parte de diversos alimentos, como albúmina, carbohidratos, lípidos (Patterson y col., 1995a,b; Simpson y Gilmour, 1997b; Doyle, 1999). No obstante, se ha observado también que, a veces, el alimento en vez de ejercer un efecto protector, hace que la aplicación de las altas presiones sea más efectiva (Linton y col., 1999) o, al menos, tan efectivas como los tampones (Gervilla y col. 2000; O'Reily 2000). La protección ejercida por los componentes de los alimentos permite concluir que a la hora de establecer unas condiciones/criterio de tratamiento mediante altas presiones para asegurar

un producto final inocuo, deben ignorarse los datos publicados acerca de la manorresistencia en tampones o medio de laboratorio, ya que no son directamente extrapolables a las situaciones reales, es decir, al alimento.

En cualquier proceso, es importante la intensidad del mismo pero también hay otros factores que influyen poderosamente en la eficacia del tratamiento; éstos son la temperatura y la acidez del medio y el tiempo de tratamiento. Recientemente, se ha publicado un estudio (Ritz y col., 2000) con *L. monocytogenes* en el que se contempla el efecto de diversos niveles de presión (200 - 600 MPa), tiempo (3, 10 y 20 minutos), temperatura (4, 20 y 40°C) y pH (5,6 y 7,0) del medio de tratamiento. El programa experimental constaba de 40 pruebas diseñadas de acuerdo con el algoritmo de Fedorov (1972). Con este modelo se pudo determinar el efecto individual de cada variable y sus interacciones en el grado de desactivación de *L. monocytogenes*. Todas las variables y sus interacciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$) en relación con la inactivación de la bacteria por las altas presiones. Los dos factores que tuvieron mayor ponderación fueron, por este orden, la presión y el pH, seguidos por la temperatura del medio y el tiempo de tratamiento. En relación con la presión se observaron diferencias de 6,9 ciclos logarítmicos ente el nivel más elevado (600 MPa) y el más bajo (200 MPa), con una relación sigmoideal entre aumentos de presión y eficacia letal. En cuanto al pH se apreció una mayor desactivación de células a bajo pH (5,6), con una diferencia de 2,34 ciclos logarítmicos a pH 7,0. A 20 °C, el efecto letal de las altas presiones fue menor (1,24 unidades logarítmicas) que a 40°C, no observándose diferencias significativas entre 20 y 4 °C. Finalmente, el tiempo de tratamiento fue la variable que menos influyó en la letalidad, encontrándose una diferencia significativa ($p < 0,01$) de 1,02 ciclos entre 3 y 20 minutos de tratamiento pero sin diferencias estadísticas entre 3 y 10 minutos. Alpas y col. (2000), aplicando altas presiones a 25 °C, llegaron a conclusiones similares, utilizando como modelo de estudio diversas especies de bacterias patógenas (*L. monocytogenes*, *Staph. aureus*, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* y *S. typhimurium*) aunque cuando la temperatura de presurización fue de 50 °C desaparecían las diferencias. Adicionalmente, estos autores informaron que en presencia de ácido láctico o ácido cítrico se aumenta la sensibilidad a las altas presiones de dichas bacterias en 1,2 – 3,9 ciclos logarítmicos. Gervilla y col. (2000) encontraron que temperaturas entre -20 y 25°C no parecen afectar a la letalidad de *Staph. aureus* CECT 534 en leche ovina, mientras que a partir de 30°C la aumenta a medida que lo hace la temperatura.

Los resultados de Ritz y col. (2000) ratifican globalmente los conseguidos por otros autores. La mayor eficacia letal a medida que aumenta el nivel de presión es de carácter general (Patterson y col., 1995a; Cheftel, 1995; Hayashi y Balny, 1997; Smelt, 1998) aunque a veces se observan diferencias destacables e incluso se ha informado (Pagan y Mackey, 2000) que una cepa (la H1071) en fase estacionaria de *E. coli* O157:H7 es más resistente a presiones elevadas (400 o 500 MPa) que a bajas (300 MPa). De hecho las verdaderas cinéticas de primer orden se alcanzan a presiones comprendidas entre 600 y 700 MPa.

En un trabajo (Alpas y col., 1999) realizado con 9 cepas de *L. monocytogenes*, 7 de *Staph. aureus*, 6 de *E. coli* O157:H7 y 6 de *Salmonella* spp se observó que un tratamiento a células en fase estacionaria de 5 minutos a 345 MPa ocasionaba reducciones (ciclos logarítmicos) en las bacterias anteriores de 0,9 - 3,5, de 0,7 - 7,8, de 2,8 - 5,6 y de 5,5 - 8,3, respectivamente. El resultado mostró que

había una gran variabilidad entre las cepas a 25 °C pero cuando la presurización se hizo a 50 °C, todas las cepas fueron más sensibles reduciéndose su número, en todos los casos, en más de 8 ciclos logarítmicos, excepto una cepa de *Staph. aureus* que incluso durante 15 minutos en las condiciones anteriores sólo se redujo su número en 6,3 ciclos. A pesar de estos datos, se ha observado a veces una mayor sensibilidad a las altas presiones a temperaturas de refrigeración que a temperaturas ambiente (Yuste y col., 1999).

En el caso de las bacterias es también una constante que el pH ácido aumenta la sensibilidad de las mismas frente a las altas presiones (Smelt, 2000; Alpas y col., 2000; Tholozan y col., 2000) pero su acción va más allá, ya que retrasa el inicio del crecimiento de las células que han sido dañadas subletalmente (Smelt, 1998). Sin embargo, hay que apuntar que los mohos y levaduras pueden multiplicarse a valores del pH más bajos que las bacterias, lo que puede estar relacionado con la mayor manorresistencia que presentan a pH inferiores a 4,0 (Smelt, 1998), habiéndose informado, por ejemplo, que *Rhodotorula rubra* presenta la misma manorresistencia en el intervalo de pH de 3,0 a 8,0 (Oxen y Knorr, 1993). Aparte de estas acciones, no se han encontrado efectos específicos de los diferentes ácidos orgánicos, lo que puede deberse a que la presurización favorece la ionización y los ácidos orgánicos son particularmente agentes inhibidores del crecimiento bacteriano en su forma no disociada (Smelt, 1998).

Otro de los factores que adquiere gran importancia es la actividad de agua (a_w) porque, por sí misma, inhibe eficazmente el crecimiento de, por el orden que se cita, bacterias, mohos y levaduras al reducirse desde valores de 0,98 - 0,99 (los que poseen la mayoría de los alimentos frescos) hasta, progresivamente, 0,62 por debajo del cual no es posible el crecimiento microbiano. Al igual que en el caso del calor, la a_w es un agente que se comporta de forma antagónica (Rodríguez y col., 2000) dado que a menor a_w mayor es la manorresistencia de los microorganismos. Así se ha comprobado en levaduras y bacterias. En *Rhodotorula rubra* (Oxen y Knorr, 1993) se ha observado que a valores de a_w por debajo de 0,94 se manifestaba un efecto protector, independientemente del soluto (sacarosa, glucosa, fructosa o NaCl) que se utilizase para reducir la a_w . Similares resultados han sido observados recientemente con *E. coli* en tampón fosfato adicionado de diferentes concentraciones de sacarosa entre 0% y 50% (Opstal y col., 2003). Asimismo, Rodríguez y col. (2000) informaron con *E. coli* que, tras un tratamiento de 414 MPa a 21°C durante 5 minutos, el número de bacterias desactivadas decrecía a medida que lo hacía la a_w desde 0,99 a 0,91. No obstante, el efecto neto de la disminución de la a_w no es fácil de predecir (Smelt, 1998) y se necesitan más investigaciones al respecto, en especial con *L. monocytogenes* que puede soportar relativamente bajas a_w (Wemekamp-Kamphuis y col., 2002).

Además de los factores antes comentados, se ha ensayado el efecto de otros muchos agentes/factores en la resistencia frente a las altas presiones de los microorganismos. Entre ellos, conservadores, como ácido sórbico que es más activo en combinación con la presurización (Mackey y col., 1995) o nisina que sensibiliza a las bacterias Gram negativas frente a las altas presiones (Kalchayanand y col., 1994; Masschalck y col., 2001a; Garriga y col., 2002), lo que se podría explicar por el mecanismo de acción de la nisina que interactúa con la membrana y es posible que penetre con más facilidad (Smelt, 1998). Las bacteriocinas también muestran una acción sinérgica, como la pediocina, como se ha comprobado con

L. monocytogenes que sufre 8 reducciones decimales en presencia de esta bacteriocina cuando se ha aplicado un tratamiento de 5 minutos a 345 MPa (Kalchayanand y col., 1998). El sistema lactoperoxidasa tiocianato también se ha mostrado eficaz junto a las altas presiones en bacterias patógenas, incluidas *Staph. aureus*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* (García-Graells y col., 2000) y alterantes, como *Pseudomonas fluorescens* (García-Graells y col., 2003). *E. coli* parece resistente (García-Graells y col., 2000; García-Graells y col., 2003) aunque el sistema lactoperoxidasa sí fue eficaz en esta especie en presencia de sacarosa (Opstal y col., 2003). Se ha estudiado también la acción combinada antimicrobiana de las altas presiones con carvacrol (Karatzas y col., 2001), lactoferrina y lactoferricina (Masschalck y col., 2001a) y lisozima (Masschalck y col., 2001b) frente a diversas bacterias Gram negativas patógenas y alterantes, observándose sinergismo entre esos agentes y las altas presiones.

Cuestión y términos en que se cuestiona

La cuestión que se plantea es analizar, a la luz de los conocimientos actuales, si el tratamiento de la carne y productos cárnicos con altas presiones es apropiado para conseguir el objetivo de seguridad alimentaria en dichos productos y lograr así un nivel adecuado de protección al consumidor.

Asimismo, se pretende establecer qué bacterias adquieren importancia en relación con la manorresistencia de las mismas y qué presurizaciones se requieren para conseguir el FSO relativo a estas bacterias en los productos cárnicos.

Evaluación del riesgo

1. Identificación del peligro

En primer lugar, conviene apuntar que ante la gran manorresistencia que presentan las esporas bacterianas, se puede decir que las altas presiones, en el estado actual de desarrollo, no parece que puedan utilizarse para la esterilización de alimentos, ya que, desde un punto de vista tecnológico, siempre sobreviviría una subpoblación que ocasionaría la alteración del producto final y, desde un punto de vista sanitario, en aquellos alimentos de actividad de agua elevada (a_w) y pH poco ácido ($> 4,5$) sería necesario, al menos, aplicar el concepto 12 D que se emplea en la industria conservera respecto a las esporas proteolíticas de *Clostridium botulinum*; serían necesarias presiones muy elevadas para conseguir esa meta si se tiene en cuenta la manorresistencia de las esporas de *Cl. botulinum* que se ha descrito, de sólo 5 reducciones logarítmicas durante 5 minutos a 827 MPa con una temperatura del medio de 50 – 55°C (Reddy y col., 1999). Las altas presiones sí pueden ser útiles, sin embargo, para conseguir la estabilidad microbiológica en aquellos alimentos que, debido a otros agentes inhibidores, las bacterias esporuladas no pueden germinar y multiplicarse, como ocurre en los productos que han aparecido en el mercado. Entre ellos, mermeladas, con una baja a_w , y ciertos zumos, con un bajo pH.

Se puede extraer una primera conclusión en el caso de la carne y productos cárnicos. Esta sería: hasta el momento, la aplicación de altas presiones queda restringida en la industria cárnica a la higienización (equivalente a pasteurización) de alimentos, lo que implica que los microorganismos a tener en cuenta principalmente son los patógenos no esporulados. No cabe duda que, al mismo tiempo, se reduciría la carga de bacterias alterantes, en especial las aerobias Gram negativas, con lo que se lograría, al tiempo, un aumento de la vida útil del producto refrigerado.

Al igual que con otras tecnologías, la higienización de un alimento mediante la aplicación de altas presiones requiere establecer unas condiciones mínimas de tratamiento que asegure que el número de microorganismos patógenos en el momento de su consumo tenga un nivel adecuado para la protección del consumidor (ALOP). El ejemplo comparativo más demostrativo que se puede exponer es el de la leche pasteurizada. El tratamiento que en su día se diseñó derivó de la termorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis* que era la bacteria patógena no esporulada más resistente a la acción letal del calor de las que podían encontrarse en la leche cruda. Si se lograba la destrucción de dicha bacteria se aseguraba la muerte de las restantes. El tratamiento térmico diseñado (75°C, 15 segundos, o su equivalente, ocasiona más de 10 reducciones decimales del número de *M. tuberculosis*), seguido de la refrigeración durante el almacenamiento posterior, se ha venido aplicando durante todo el siglo XX, obteniéndose un producto final con un buen registro sanitario.

En el caso presente, la situación es similar; es necesario conocer de entre las bacterias patógenas que pueden encontrarse en la carne y productos cárnicos, cuales son las más manorresistentes, cómo influyen en la manorresistencia los distintos agentes y factores ambientales y, en definitiva, qué condiciones prácticas son las más adecuadas para conseguir reducir su número hasta niveles estadísticamente despreciables, es decir, los que se deriven del ALOP que se establezca.

De la tabla 1 (apéndice I) se desprende que tres son las bacterias que presentan mayor resistencia frente a las altas presiones: *Staph. aureus* > *E. coli* O157:H7 > *L. monocytogenes*. La primera no es peligrosa *per se* sino que su carácter patógeno deriva de las enterotoxinas que produce durante su multiplicación. Las otras dos son bacterias que al multiplicarse en el organismo producen la enfermedad. Estas bacterias se puede controlar en los alimentos, desactivándolas (tratamientos térmicos, radiaciones, altas presiones, etc.) o previniendo su crecimiento (aplicación de frío, baja actividad de agua, sustancias inhibidoras, etc.). *L. monocytogenes* se diferencia de las otras dos en una peculiaridad de gran importancia práctica; es la facultad que tiene de multiplicarse a temperaturas de refrigeración, es decir, es una bacteria psicrotrofa que, conlleva, como se verá más adelante, la necesidad de controlar su presencia.

A pesar de la potenciación del efecto letal de las altas presiones por los diversos agentes/factores que se han discutido en el apartado anterior, es probable que en algunos productos cárnicos no se pueda hacer uso de los mismos porque su adición, por la singularidad del producto (p.e. jamón cocido) o por la expresa prohibición legal (p.e. carne picada), no puede llevarse a cabo o simplemente un fabricante no desea hacerlo para ofrecer al consumidor un producto genuino. En consecuencia, la selección de los microorganismos "diana" ha de hacerse de acuerdo con la manorresistencia inherente de los mismos.

Son, pues, tres especies las que han de tenerse en cuenta. En primer lugar *Staph. aureus* que es la más resistente frente a la acción letal de las altas presiones y, en segundo lugar, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*.

2. Caracterización del peligro.

2.1. *Staphylococcus aureus*

Staph. aureus es una bacteria ubicua, siendo el principal reservorio el hombre de tal forma que la persona colonizada es portadora de estafilococos, lo que supone una diseminación de los mismos a otros

individuos o alimentos. Una de las dificultades para controlar *Staph. aureus* es el gran número de reservorios humanos y animales que hay. Asimismo, se encuentra en el polvo, aire, desechos, agua, etc. de donde fácilmente puede pasar a los alimentos. Sin embargo, las características de crecimiento y supervivencia de *Staph. aureus* (véase apéndice II) permiten deducir que el control de *Staph. aureus* es fácil en alimentos refrigerados, ya que a temperaturas por debajo de 8–10 °C no se multiplica. Por tanto, en la carne fresca y productos cárnicos pasteurizados que requieren un almacenamiento bajo refrigeración no ha de preocupar la presencia de *Staph. aureus*. Por otra parte, si se produjera un abuso de temperatura de unos pocos grados (p.e. hasta 12–14°C) durante la distribución del producto y su almacenamiento en el hogar, su multiplicación sería muy lenta y el número de células difícilmente alcanzaría el nivel de 10^5 – 10^6 g⁻¹ necesario para acumularse una cantidad de toxina suficiente para que se presentase los síntomas de la intoxicación. En consecuencia, se debe descartar esta especie como microorganismo “diana” para la evaluación de la eficacia de las altas presiones en productos cárnicos.

2.2. *E. coli* O157:H7

Para comprender el peligro que supone la ingestión de *E. coli* O157:H7 con los alimentos, baste decir que es la bacteria causante de una grave enfermedad que cursa con colitis hemorrágica, dolores abdominales, vómitos, síndrome urémico hemolítico (HUS), con una mortalidad relativamente elevada, sobre todo en niños menores de 5 años y ancianos (AGA, 1994; Tarr, 1994), habiéndose observado en los últimos una mortalidad de hasta el 50% aunque en individuos normales se sitúa, como media, entre el 2 y el 7% de los pacientes que presenta el síndrome HUS (WHO, 1997). Además, la dosis infectiva es muy baja, aceptándose un valor inferior a 100 células por gramo de alimento (ICMSF, 2002) y aún es menor (probablemente unas 10 células g⁻¹) en individuos especialmente susceptibles, como ancianos, niños, inmunocomprometidos, etc. (Meng y col., 2001; ICMSF, 2002).

El reservorio más importante de *E. coli* O157:H7 es el ganado vacuno (piel e intestino) donde su prevalencia es elevada, habiéndose aislado en el 36% de vacas y 57% de terneras de 80 cabezas analizadas en Canadá (Wilson y col., 1996) y en el 3,2% de 191 terneras estudiadas en EEUU (Zhao y col., 1995). No obstante, se han detectado también en otros animales de abasto, domésticos y silvestres, como ovejas, cabras, cerdos, caballo, perros, gatos, ratas, ciervo, gaviota, etc. (Chapman, 2000) e incluso en cebú (Kaddu-Mulindwa y col., 2001). En los animales de abasto llega a la canal a partir de la piel e intestino durante el sacrificio de donde puede pasar a piezas cárnicas de menor tamaño y llegar últimamente a la carne picada, que sirve como ingrediente de diversos productos RTE (hamburguesas, salchichas, albóndigas, etc.). También adquiere importancia la contaminación cruzada en cocinas y establecimientos colectivos desde la carne de vacuno a otros alimentos RTE. *E. coli* O157:H7 puede llegar al hombre también por contacto directo con animales (WHO, 1997). En el hombre, las personas que han padecido la enfermedad eliminan células de *E. coli* O157:H7 con las heces durante semanas (Karch y col., 1995) pero no se ha identificado un portador asintomático de largo término. Por ello, se ha deducido que la contaminación entre humanos es de persona a persona.

Es difícil comparar los datos procedentes de diferentes países acerca de la incidencia y prevalencia de *E. coli* O157:H7 en la carne debido a los distintos métodos de estudio que se han empleado.

No obstante, se puede decir que es un patógeno que preocupa a nivel internacional con estimaciones de su prevalencia en la carne del 1,5% - 5% (ICMSF, 2002).

La información anterior, unida a la incluida en el apéndice II, permite deducir el peligro que supone la presencia de *E. coli* O157:H7 en la carne y productos cárnicos, sobre todo en los RTE, es decir, en lo que se consumen sin ningún tratamiento culinario previo. Es, pues, un microorganismo "diana" para establecer las condiciones de tratamientos por altas presiones de la carne y productos cárnicos para la obtención de un producto final con un nivel apropiado de protección al consumidor.

2.3. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es el agente causal de una enfermedad que se adquiere por su ingestión con los alimentos aunque también puede transmitirse de la madre al feto. La enfermedad puede ser leve o severa y no cursa, como otras enfermedades intestinales, con fiebre, dolores abdominales, diarrea, etc. sino que se manifiesta, en su versión leve, con fiebre, dolores musculares y a veces náusea. La modalidad severa (invasiva) se caracteriza por fiebre repentina, dolor de cabeza intenso, rigidez del cuello y mareos, pudiendo invadir el sistema nervioso con la aparición de pérdidas del equilibrio y convulsiones, meningitis y encefalitis y, finalmente, septicemia. Aunque cualquier persona puede adquirir la enfermedad, es muy poco común en niños, jóvenes y adultos con el sistema inmunitario sano pero hay un sector de la población, que se ha calculado en alrededor del 15% (Buchanan y col., 1997), especialmente sensible. Entre estos individuos pueden citarse a embarazadas (pueden abortar o presentar un parto prematuro), recién nacidos (pueden presentar retraso mental e hidrocefalia), inmunocomprometidos (afectados de cáncer, SIDA, trasplantes, diabetes u otras enfermedades). Son estos individuos los propensos a adquirir la modalidad severa de la enfermedad que en EEUU se estima se ven implicadas anualmente alrededor 2.500 personas, de las cuales 500 mueren (CDCP, 2003).

L. monocytogenes está ampliamente distribuida en todos los ambientes (alimentos, vegetación en descomposición, ensilados, agua, suelos, residuos fecales, heces de humanos y animales sanos, etc.) y se ha estimado que entre el 2 y el 6% de los humanos son portadores mudos aunque el papel que éstos desempeñan en la diseminación de la enfermedad no se sabe aún (Rocourt, 1996). Los brotes de listeriosis que se han presentado y las investigaciones epidemiológicas han permitido deducir que los alimentos RTE son de alto riesgo para individuos susceptibles. Los alimentos RTE que se contaminan después de haber recibido un tratamiento térmico y se mantienen bajo refrigeración proporcionan un excepcional ambiente para el crecimiento de *L. monocytogenes*, debido a la reducción de la microbiota competitiva; esta situación es más favorable aún si la a_w se sitúa en los niveles de 0,90 - 0,94 a la que muchos de los microorganismos alterantes de carácter psicrotrofo no pueden multiplicarse o lo hacen lentamente. Por otra parte, *L. monocytogenes* se adhiere fuertemente a la superficie de las carnes y es difícil eliminarla o inactivarla. *L. monocytogenes* se multiplica fácilmente en los productos cárnicos refrigerados, incluso los envasados a vacío, a pH próximos a 6,0 pero su crecimiento es muy lento a pH de 5,0 (Farber y Peterkin, 1999; Glass y Doyle, 1989). Las listerias son muy difíciles de eliminar, e incluso de reducir su incidencia, en los establecimientos que elaboran este tipo de productos, debido a que las bacterias se alojan en zonas muy recónditas de los equipos, como juntas, vál-

vulas, etc. donde puede persistir durante años y en cualquier momento puede contaminar el alimento, incluso si el producto ha estado libre de listerias durante meses (ICMSF, 2002).

No se sabe cual es la dosis infectiva. Sin embargo, los datos publicados (véase apéndice II) indican que se sitúa entre 10^2 y 10^6 u.f.c. g^{-1} (ICMSF, 2002). Aunque *L. monocytogenes* está ampliamente distribuida en todos los entornos y puede aislarse de numerosos alimentos, la listeriosis en humanos es relativamente rara, de 2 –3 (Mead y col., 1999) a 5 – 6 (CDCP, 2000) casos anuales por millón de individuos. Estas circunstancias apoyan la opinión de que las infecciones se producen por dosis elevadas de células de *L. monocytogenes* (Notermans y col., 1998; SCVPH, 1999).

La presencia, pues, de *L. monocytogenes* en la carne y productos cárnicos constituye un grave peligro para los humanos. Sus características (véase apéndice II), especialmente su manorresistencia y su psicrofilia, hacen que esta bacteria sea, junto a *E. coli* O157:H7, un microorganismo “diana” para establecer las condiciones de tratamientos por altas presiones de la carne y productos cárnicos para obtener un producto final con un nivel apropiado de protección al consumidor.

3. Establecimiento del objetivo de seguridad alimentaria (FSO)

Para establecer qué tratamiento por altas presiones mínimo debe aplicarse a los productos cárnicos para que el producto esté exento de *E. coli* O157:H7 y de *L. monocytogenes* hasta un aceptado nivel de protección del consumidor, lo más oportuno, quizás sea utilizar los argumentos y criterios que algunas instituciones (FDA, 1999, 2001; ICMSF, 2002) han empleado para estimar en hamburguesas y salchichas tipo frankfurt, respectivamente, el FSO (máxima frecuencia o concentración de un peligro microbiano en un alimento en el momento de su consumo que ofrece un adecuado nivel de protección) y establecer así el tratamiento térmico que debe aplicarse para conseguir el correspondiente FSO que, en el presente caso, se correspondería por el tratamiento con altas presiones.

3.1. Estimación del FSO para *E. coli* O157:H7

De acuerdo con la baja dosis infectiva de *E. coli* O157:H7 (< 100 células e incluso una decena para individuos susceptibles), la gravedad de la enfermedad que ocasiona, los datos disponibles de los brotes que han ocurrido y adoptando una actitud conservadora, la ICMSF (2002) sugiere un FSO para hamburguesas de una tasa final de *E. coli* O157:H7 de 1 u.f.c. $250 g^{-1}$ ($- 2,4 \log_{10}$ u.f.c. g^{-1}), lo que equivale a no más de 1 célula por cada dos hamburguesas de 125 g cada una.

Por otra parte, teniendo en cuenta los datos de incidencia de *E. coli* O157:H7 en la carne, la ICMSF (2002) ha estimado que, en el peor de los casos, el número de células de *E. coli* O157:H7 que puede existir por gramo de carne fresco es de 100. Por lo tanto, para lograr el FSO señalado anteriormente en el momento del consumo de la hamburguesa es necesario conseguir 4,4 reducciones decimales. Los parámetros que se han descrito sobre la termorresistencia de *E. coli* O157:H7 son, por ejemplo a $62,8$ °C, un valor D de 24 segundos (véase apéndice II), lo que significa que con un tratamiento térmico a esa temperatura en el punto más frío de la pieza bastaría con unos 2 minutos para lograr el FSO.

Este mismo criterio se podría emplear para *E. coli* O157:H7 en el tratamiento de productos cárnicos crudos susceptibles de ser tratados mediante altas presiones, es decir, un FSO de $-2,4 \log_{10}$ u.f.c.

g^{-1} partiendo de una tasa original de 10^2 u.f.c. g^{-1} que conllevaría al menos 4,4 reducciones decimales. En otros productos, como los RTE, como los que han sido previamente cocidos industrialmente y se lonchean para su venta al detalle (jamón cocido, mortadela, chopped, etc.), el FSO ha de ser el mismo pero, en cambio, la tasa original de *E. coli* O157:H7 será más baja. La ICMSF (2002) no analiza este caso porque *E. coli* O157:H7 difícilmente se multiplica durante el almacenamiento bajo refrigeración pero sí lo hace en el caso de *L. monocytogenes* en el que asume una recontaminación de 10 células g^{-1} . Como, por una parte, *E. coli* O157:H7 es una bacteria con menor ubicuidad que *L. monocytogenes* y, por otra, la posibilidad de *E. coli* O157:H7 de alcanzar aleatoriamente el producto tras su procesado es menor, se podría, imitando la hipótesis de la ICMSF para *L. monocytogenes*, rebajar el número de células que recontaminan el alimento, hasta incluso 1 célula g^{-1} . Entonces, 2,4 reducciones decimales sería suficiente para lograr el objetivo microbiológico y, en consecuencia, se podría disminuir, en los alimentos RTE, la intensidad del tratamiento por altas presiones.

En conclusión, en el caso de *E. coli* O157:H7, el FSO para productos cárnicos crudos y para productos RTE podría establecerse en un tratamiento que logre, respectivamente, 4,4 y 2,4 reducciones decimales del número de células.

3.2. Estimación del FSO para *Listeria monocytogenes*

Aunque la ICMSF (2002) utiliza como modelo las salchichas tipo frankfurt, los criterios y conceptos que se hacen para evaluar el riesgo de *L. monocytogenes* en este alimento son extrapolables a otros tipo de salchichas como las de tipo bologna, diversas variedades de productos cocidos preparados con pasta fina, como mortadela, galantina, etc. e incluso a paleta y jamón cocidos y también a otros alimentos RTE. El tratamiento térmico ($> 75^\circ\text{C}$) que desde un punto de vista tecnológico se aplica en la industria (coagular la proteína, formación del gel, fijar el color con el nitrito, destruir bacterias alterantes y patógenas) para fabricar productos cocidos de esta naturaleza es suficiente para destruir *L. monocytogenes* y el resto de patógenos no esporulados. No ha de preocupar, pues, el producto en el que se ha practicado la cocción en el envase y se libra al mercado y se consume inmediatamente una vez abierto el mismo. Sin embargo, otros se envasan tras el calentamiento y muchos de ellos se lonchean para preparar raciones domésticas. En estos casos puede producirse la recontaminación por *L. monocytogenes*. Es un requisito de todos estos productos su almacenamiento bajo refrigeración.

El proyecto definitivo del reglamento de la Comisión Europea relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios especifica en relación con *L. monocytogenes*, dejando aparte los alimentos para lactantes (ausencia en 25 g), lo siguiente:

- a) En alimentos listos para el consumo que pueden permitir el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean los destinados a lactantes ni a usos médicos especiales, ausencia en 25 g ($n = 5$; $c = 0$; $m = 0$) al final del proceso de fabricación; < 100 u.f.c. g^{-1} ($n = 5$; $c = 0$; $m = < 100$) y 100 u.f.c. g^{-1} ($n = 5$; $c = 0$; $m = 100$) en productos comercializados antes del final y al final de la vida útil, respectivamente.
- b) En alimentos listos para el consumo que no permitan el desarrollo de *L. monocytogenes* ($\text{pH} < 4,4$ o $a_w < 0,92$), que no sean los destinados a lactantes ni a usos médicos especiales, 100 u.f.c. g^{-1} ($n = 5$; $c = 0$; $m = 100$) al final del proceso de fabricación y en productos comercializados.

La ICMSF (2002), basándose en datos y criterios similares a los mencionados para el caso de *E. coli* O157:H7 y teniendo en cuenta que *L. monocytogenes* puede multiplicarse en los alimentos RTE refrigerados, concluye también que el FSO para los productos RTE relativo a esta bacteria pudiera ser de 100 u.f.c. g⁻¹. En sus deducciones para el cálculo del FSO en frankfurters parte de una tasa original de 1.000 células g⁻¹ en la carne. Es una postura conservadora.

Admitiendo, pues, un FSO de 100 u.f.c. g⁻¹ de carácter general en el momento del consumo del producto y una tasa original de 1.000 células g⁻¹ en el alimento crudo se necesitaría para conseguir el FSO un tratamiento térmico durante el proceso de fabricación que ocasionara sólo una reducción decimal. Sin embargo, las células de *L. monocytogenes* supervivientes al tratamiento térmico pueden multiplicarse durante el almacenamiento bajo refrigeración, especialmente en alimentos de larga vida útil y en el momento del consumo haya sobrepasado el nivel de 100 u.f.c. g⁻¹. Es necesario asegurar que este fenómeno no se produce y, por ello, se requiere aplicar un criterio más severo. La ICMSF establece que una reducción de 6D sería suficiente, pues resultaría en 1 u.f.c. kg^{-1} (es decir, $10^{-3} \text{ u.f.c. g}^{-1}$) tras la cocción en caso que se aplique un tratamiento térmico aunque si se adoptaran medidas higiénicas adecuadas durante la manipulación del producto fresco y se aplicaran acciones (no permitir que ascienda la temperatura durante el almacenamiento refrigerado) para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* hasta su consumo, se podría aplicar un tratamiento algo más suave, por ejemplo, que provocara un reducción de 5D.

De acuerdo con los parámetros térmicos de *L. monocytogenes* descritos en carne picada (véase apéndice II) y con los tratamientos térmicos aplicados en la práctica, por ejemplo, un $F_{70^{\circ}\text{C}} = 5$ minutos para salchichas tipo frankfurt o $F_{65^{\circ}\text{C}} = 50$ minutos para jamón cocido en el punto más frío (Reichert, 1987), puede deducirse que se producirían unas 28 reducciones decimales, es decir, se logra siempre el FSO en los productos cocidos y, por tanto, no han de preocupar los productos que abandonan la industria ni siquiera con un periodo de almacenamiento bajo refrigeración largo, siempre que el proceso de cocción se haya efectuado una vez envasado el producto y se mantenga en el mismo hasta su consumo.

Sin embargo, la experiencia indica que es muy común la recontaminación del producto tras el proceso de cocción, durante su distribución al detalle. De hecho, se ha detectado *L. monocytogenes* en los productos finales, tal es el caso de las frankfurters (ICMSF, 2002) y en alguna ocasión se han aislado incluso de salchichas que se habían mantenido en el frigorífico de un paciente 4 meses después de su fabricación (Wenger y col., 1990). De igual forma, la contaminación puede acaecer durante el loncheado de piezas cocidas (jamón cocido, mortadela, paleta, etc.) o no (jamón curado, embutidos, etc.) para su venta al detalle dado que cualquier microorganismo ubicuo, como *L. monocytogenes*, puede alcanzar potencialmente el producto en cualquier momento y en el caso de esta bacteria puede incluso aumentar su número durante el almacenamiento bajo refrigeración si las condiciones (a_w , pH, etc.) del producto lo permiten.

Tomando una postura conservadora, la ICMSF (2002) estima que una recontaminación en operaciones posteriores a la cocción puede, en el peor de los casos, alcanzar la tasa de 10 células g⁻¹. Lo mismo podría ocurrir durante el loncheado o manipulación de los productos RTE. Si se supone, en los productos que lo permitan, que durante el almacenamiento y distribución podría aumentar la tasa en $5 \log_{10}$

g^{-1} (ICMSF, 2002) quiere decir que en el momento del consumo existirían 10^6 u.f.c. g^{-1} , un valor totalmente insatisfactorio. Para evitar este incremento y ajustarse al objetivo microbiológico se podría hacer uso de un tratamiento con altas presiones. Anteriormente se ha mencionado que el objetivo microbiológico para productos cocidos elaborados en una industria podría situarse en ≤ 1 célula kg^{-1} (es decir 10^{-3} g^{-1}). Supóngase, de acuerdo con la ICMSF (2002), que la recontaminación, en el peor de los casos, es la anteriormente manifestada, es decir, de 10 células g^{-1} . Se conseguiría el nivel final de ≤ 1 célula kg^{-1} mediante un tratamiento que ocasionará 4 reducciones decimales. Si se admite un crecimiento durante el almacenamiento y distribución igual al anteriormente indicado, es de decir, $5 \log_{10}$ g^{-1} , el producto, en el momento de su consumo, contendría 10^2 u.f.c. g^{-1} , o sea, se cumpliría el FSO.

En conclusión, en el caso de *L. monocytogenes*, el FSO para productos cárnicos crudos y para productos RTE se conseguiría con tratamientos que ocasionaran, respectivamente, 6 y 4 reducciones decimales del número de células.

4. Consecución del FSO

4.1. Consecución del FSO para *E. coli* O157:H7

A la vista, por una parte, de los datos publicados (resumidos en la tabla 1 recogida en el apéndice I) acerca de la resistencia en matrices alimentarias de *E. coli* O157:H7 frente a la acción letal de las altas presiones y, por otra, el FSO ($-2,4 \log_{10}$ u.f.c. g^{-1}) que se requiere alcanzar (equivalente a 4,4 reducciones decimales), para conseguir, desde un punto de vista microbiológico, un producto cárnico seguro, puede concluirse que se necesitarían tratamientos superiores a 600 MPa para lograr el FSO en los productos cárnicos crudos. Con ello, en los alimentos que lo requieran, se salvaguarda la posibilidad de un cocinado con calentamiento insuficiente. En el caso de productos cocidos procesados industrialmente y otros alimentos RTE que se manipulan después de su procesado sería suficiente un tratamiento de 300 - 400 MPa, dado que en este caso el tratamiento tendría que reducir la tasa de *E. coli* O157:H7 sólo 2,4D.

4.2. Consecución del FSO para *Listeria monocytogenes*

A la vista, por una parte, de los datos publicados (resumidos en la tabla 1 del apéndice I) acerca de la resistencia en matrices alimentarias de *L. monocytogenes* frente a la acción letal de las altas presiones y, por otra, la tasa de bacterias (10^{-3} u.f.c. g^{-1}) que se requiere conseguir para lograr, desde un punto de vista microbiológico, un producto cárnico crudo seguro, puede concluirse que difícilmente se alcanzaría el objetivo aplicando solamente altas presiones, ya que sería necesario reducir el número de células en 6D para lo que se requerirían presiones superiores a 600 MPa.

Sin embargo, si se trata de alimentos que han sido procesados (jamón cocido, mortadelas, jamón curado, embutidos, otros productos RTE, etc.) que se preparan después para su distribución al consumidor (lonchas, piezas pequeñas, granulados como ingredientes de alimentos RTE, etc.) la situación es totalmente diferente. La potencial contaminación del producto por *L. monocytogenes* post-proceso y el carácter psicrotrofo de esta bacteria hace que no sea posible asegurar que el alimento que llega al consumidor posea un número de células inferior a 100 u.f.c. g^{-1} . Por ello, en el presente caso, la aplicación de altas presiones (500 MPa) permitiría claramente reducir 4D el número de células de

L. monocytogenes y alcanzar así un adecuado ALOP. Las altas presiones pueden ser, pues, un método extremadamente útil para librar al mercado productos RTE finales seguros.

En la actualidad, se está aplicando un tratamiento de 400 MPa durante unos minutos para reducir el número de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado para su exportación. Este tratamiento ocasiona 3 reducciones decimales y los análisis de control que se ha realizado no han detectado el microorganismo (Tapiador, 2004). Asimismo, se ha informado que en salchichas frankfurt, un tratamiento de este nivel (400 – 500 MPa durante 9 minutos) provoca una reducción del número de *L. monocytogenes* de 5 unidades logarítmicas (Shellhammer y Yousef, 2000) y que presurizaciones (600 MPa durante 6 minutos) aplicadas a jamón cocido, jamón curado y carne de vacuno marinada reduce de forma importante la tasa de *L. monocytogenes* hasta tal punto que, en comparación con muestras controles, se observa ausencia en 25 g tras 120 día de almacenamiento bajo refrigeración (Garriga y col., 2003).

En ambos casos (*E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*), como al aumentar la temperatura del tratamiento en unos pocos grados (una decena, por ejemplo) se incrementa notablemente la sensibilidad de las dos bacterias a la acción letal de las altas presiones, se hace especial énfasis en que se aplique el tratamiento a temperatura más elevada (40 – 50 °C), siempre que los atributos del alimento lo permitan, lo que ayudaría a conseguir el FSO.

Conclusiones

En el estado actual de desarrollo, las altas presiones no pueden utilizarse para conseguir la esterilidad comercial de la carne y productos cárnicos. Sólo pueden emplearse como medio de lograr la higienización de los mismos.

Los microorganismos de mayor importancia sanitaria en los productos cárnicos y que, por razones de manorresistencia, han de fijar la intensidad de los tratamientos por altas presiones son *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*.

En los productos cárnicos crudos que, dados sus atributos sensoriales y propiedades bioquímicas, permitan la aplicación de altas presiones, es difícil conseguir el FSO en relación con ambas bacterias, ya que sería necesario aplicar presurizaciones muy elevadas, del orden de 700 – 800 MPa.

Los productos cárnicos listos para su consumo elaborados a partir de alimentos procesados pueden contaminarse durante su manipulación post-proceso (loncheado, laminado, preparación de piezas domésticas, envasado en raciones, etc.). La aplicación de altas presiones en ellos es de gran utilidad para alcanzar el FSO, lo que se lograría con presurizaciones de 400 – 500 MPa durante varios minutos. Se conseguiría así la obtención de productos seguros.

Siempre que los atributos del alimento lo permitan, la aplicación de altas presiones a temperaturas más elevadas (por ejemplo, 30 - 50 °C) que las de refrigeración o ambiente ayudaría a conseguir el FSO.

Referencias

AGA (American Gastroenterological Association) (1994). Consensus Conference Statement. *E. coli* O157:H7 Infections: an emerging national health crisis. July 11 – 13.

- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C.P. y Ray, B. (1999). Variation resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4248 – 4251.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F. y Ray, B. (2000). Interaction of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of food borne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 33 – 42.**
- Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P., eds. (1992). *High Pressure and Biotechnology*. J. Libbey, London.
- Barbosa-Cánovas, G.V. y Gould, G.W. 2000. *Innovation in food processing. Food preservation technology series*. Techomic. Basel.
- Basset, J., Lépine, P., and Chaumont, L. (1956). Effet des hautes pressions sur le virus de la poliomyélite (source Lansing). *Ann. Inst. Pasteur* 90, 575 – 596.
- Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M. A., Robinson, T. P. y Mackey, B. M. (1999) Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7 to high pressure, mild heat, and other stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1565 – 1569.
- Buchanan, R. L., Damert, W. G., Whiting, R. C. y van Schothorst, M. (1997) The use of epidemiologic and food survey data to estimate a conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. *J. Food Prot.* 60, 918 – 922.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Gervilla, R., Yuste, J. and Guamis, B. (2000). Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese. *Food Microbiol.*, 17, 633-641.
- CDCP (Centers for Diseases Control and Prevention) (2000). Preliminary FoodNet data on the incidence of food-borne illness-selected sites, United States, 1999. Morbidity and Mortality Weekly Report, 49, 2001 – 2005.
- CDCP (Centers for Diseases Control and Prevention) (2003). Disease information. Listeriosis. Revised 01/12/03. http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_g.htm.
- Cerf, O. (1977). Tailing in survival curves of bacterial spores. *J. Appl. Microbiol.* 42, 1 – 20.
- Crossland, B. (1995). The development of high pressure equipment. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D.E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Chapman, P. A. (2000) Sources of *Escherichia coli* O157 and experiences over the 15 years in Sheffield, UK. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement*, 88, 515 – 605.
- Cheftel, J. C. (1995) Review: High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci Technol. Int.* 1, 75 – 90.
- Doyle, E. (1999) Use of high pressure to control *Listeria* in meat. <http://www.amif.org/Listeria%20Pressure.pdf>
- Earnshaw, R. G. (1995) High pressure microbial inactivation kinetics. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Earnshaw, R. G., Appleyard, J. y Hurst, R. M. (1995) Understanding physical inactivation processes – combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *Int. Food Microbiol.* 28, 197 – 219.
- Farber, J. M. y Peterkin, P. I. (1999). Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. En: "Listeria, listeriosis and food safety". 2ª ed. Eds. E. T. Ryser y E. H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Farkas, D. F. y Hoover, D. G. 2000. High pressure processing. En "Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technology. *J. Food Sci. Special Supplement*. 65, 14 – 16.
- Fedorov, V. V. (1972) Theory of optimal experiments. Academic Press. New York.
- FDA (US Food and Drug Administration) (1999) Food Code. Washington D. C. US Department of Health and Human Service, Public Health Service. Food and Drug Administration.
- FDA (US Food and Drug Administration) (2001) Food Code. Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Center for food safety and applied nutrition. Washington D.C. US Department of Health and Human Service.

- García-Graells, C., Valckx, C. y Michiels, C. W. (2000). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatments high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4173 –4179.
- García-Graells, C., Van Opstal, I., Vanmuysen, S. C. M. y Michiels, C. W. (2003). The lactoperoxidase systems increases efficacy of high pressure inactivation of foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 81, 211 –221.
- Garriga, M.; Aymerich, M. T., Costa, S., Monfort, J. M. y Hugas, M. (2002) Bactericidal synergisms through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food. Microbiol.*, 19, 509 – 518.
- Garriga, M.; Marcos, B. Aymerich, M. T. y Hugas, M. (2003) Prospectiva de aplicación de altas presiones para la minimización de riesgos asociados a *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en embutidos madurados en frío. *Eurocarne*. XII. 121, 93 – 99.
- Gervilla, R., Capellas, M., Ferragut, V. y Guamis, B. (1997). Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. *J. Food Prot.* 60, 33 – 37.
- Gervilla, R., Ferragut, V. y Guamis, B. (2000). High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents *J. Dairy Sci.* 83, 674 – 682.
- Glass, K. A. y Doyle M. P. (1989). Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1565 – 1569.
- Hashizume, C., Kimura, K y Hayashi, R. (1996) Kinetics analysis of yeast inactivation by high pressure treatment at low temperature. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1455 – 1458.
- Hayashi, R. y Balny, C. (1996). High Pressure Bioscience and Biotechnology. Elsevier. Amsterdam.
- Heinz, V. y Knorr, D. (1996) High pressure inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* cells by a three-state-model considering distributed resistance mechanisms. *Food Biotechnol.*, 10, 149 – 161.
- Hite, B. H. (1899) The effect of pressure on the preservation of milk. *West Virginia Univ. Agric. Exp. Sta. Bull.*, 58, 15 – 35.
- Hite, B. H., Giddings, N. J. y Weakly, C. E. (1914) The effect of pressure on certain microorganisms encountered in preserving fruits and vegetables of milk. *West Virginia Univ. Agric. Exp. Sta. Bull.*, 146, 3 – 67.
- Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A. M., Farkas, D. F. y Knorr, D. (1989) Biological effects of high hydrostatic pressure. *Food Technol.*, 43, 99 – 107.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (1996). Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. 299 – 333. Chapman & Hall. London.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (2002). Microorganisms in foods 7. Microbiological testing in food safety management 313 – 332. Kluwer Academic Plenum Publishers & Hall. New York.
- Isaacs, N. S., Chilton, P. y Mackey, B. (1995). Studies on the inactivation by high pressure of microorganisms. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Jaenicke, R. (1991) Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* 202, 715 –728.
- Johnston, D. E. (1995) High pressure effects on milk and meat. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Jurkiewicz, E., Villas-Boas, M., Silva, J. L., Weber, G., Hunsmann, G., and Clegg, R. M. (1995). Inactivation of simian immunodeficiency viruses by hydrostatic pressure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 6935-6937.
- Kaddu-Mulindwa, D., Aisu, T., Gleier, K., Zimmermann, S. y Veutin, L. (2001). Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faecal samples from children with diarrhoea and from healthy zebu cattle in Uganda. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 95- 101.
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C. P. y Ray, B. (1994). Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4174 – 4177.

- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C. P. y Ray, B. (1998). Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 61, 425 – 431.
- Kalchayanand, N., Ray, B., Sikes, T. y Dunne, C. P. (2001). Complete destruction of *Listeria monocytogenes* in hot dogs by hydrostatic pressure and bacteriocin-based biopreservatives. University of Wyoming Annual Science Research Report 2001.
- Karatzas, K. A., Kets., Smid, E. P. W. y Bennik, M. H. (2001) The combined action of carvacrol and high pressure on *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 90, 463 - 469.
- Karatzas, K. A. G., y Bennik, M. H. (2002) Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3183 - 3189.
- Karch, H., Russmann, H., Schmidt, H., Schwarzkopf, A y Heesemann, J. (1995). Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on diarrheal diseases. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1602 – 1605.
- Kingsley, D. H., Hoover, D. G. Papafragkou, E. and Richards, G.P. (2002). Inactivation of hepatitis A virus and a Calicivirus by high hydrostatic pressure. *J. Food. Prot.*, 65, 1605-1609.
- Knorr, D. (2000). Process aspect of high pressure treatment of food systems. En "Innovations in food processing" Eds. G. V. Barbosa-Cánovas y G. W. Gould. Technomic Pub Co., Inc. Basel.
- Larson, W. P., Hartzell, T. B., y Diehl, H. S. (1918) The effect of high pressures on bacteria. *J. Infec. Dis.*, 22, 271 – 281.
- Ledward, D. A. (1995) High pressure processing -The potential. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Ledward, D. A., Johnson, D. E., Earnshaw, R. G. y Hasting, A. P. M. (1995). High pressure processing of foods (eds.). Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Linton, M., McClements, J. M. J. y Patterson, M. F. (1999) Survival of *E.coli* O157:H7 during storage of treated orange juice. *J. Food Prot.*, 62, 1038 – 1040.
- Mackey, B. M., Forestiere, K., Isaacs, N.S., Stenning, R. y Brooker, B. (1994). The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Let. Appl. Microbiol.*, 19, 429 - 432.
- Mackey, B. M., Forestiere, K., Isaacs, N. (1995). Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnol.*, 9, 1 – 11.
- McClements, J. M. J., Patterson, M. F. y Linton, M. (2001). The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *J. Food Prot.*, 64, 514-522.
- McMeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T. y Ratkowsky, D.A. (1993). En "Predictive Microbiology: theory and applications" John Willey and Son. New York.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Michiels, C.W. (2001a). High pressure increases bacterial activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *Int. Food Microbiol.*, 64, 325 – 332.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Van Haver, E. G. R. y Michiels, C. W. (2001b). Inactivation of gram negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 339 – 344.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1999) Food related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607 – 625.
- Meng, J., Doyle, M., Zhao, T. y Zhao, S. (2001). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. En: "Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers" 2ªed. Eds. M.P. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville. ASM Press. Washington D.C.
- Mossel, D. A. A., Corry, J. E. L., Struijk, C.B. y Baird, R.M. (1995). Factors affecting the fate and activities on microorganisms in foods. En "Essentials of the Microbiology of foods" - A textbook for advances studies. Eds. D.A.A. Mossel, J. E. L. Corry, C. B. Struijk and R. M. Basird). John Willey and Son.
- Mussa, D. M., Ramaswamy, H. S., Smith, J. P. (1999). High pressure destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* on pork. *J. Food Prot.*, 62, 40 - 45.

- Nakayama, A., Yano, Y., Kobayashi, S., Ishikawa, M. y Sakai, K. (1996) Comparison of pressure resistances of spores of six *Bacillus* strains with their heat resistances. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3897 – 3900.
- Notermans, S., Duffenne, J., Teunis, P. y Chackraborty, T. (1998). Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 61, 244 – 248.
- Oliveira, A. C., Valente, A. P., Almeida, F. C. L., Lima, S. M. B., Ishimaru, D., Gonçalves, R. B., Peabody, D., Foguel, D., Silva, J. L. (1999). Hydrostatic pressure as a tool to study virus assembly: pressure-inactivation of viruses by formation of fusion intermediate states. En "High Pressure Molecular Science". Eds. R. Winter, y J. Jonas, 497-513. NATO Science Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Opstal, van I., Suzy, C. M. y Vanmuysen, C. W. M. (2003). High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. *Int. J. Food Microbiol.*, 88, 1 – 9.
- O'Reilly, C. E., O'Connor, P. M., Kelly, A. L., Beresford, T. P. y Murphy, P. M. (2000). Use of Hydrostatic Pressure for Inactivation of Microbial Contaminants in Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4890–4896.
- Oxen, P. y Knorr, D. (1993) Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *Lebens. Wissens. Technol.*, 23, 220 – 223.
- Pagan, R. y Mackey, B. (2000) Relationship between membrane damage and cell death in pressure treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential and stationary phase cells and variation among strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2829 – 2834.
- Palou, E., López-Malo, A.; Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. 2002. El tratamiento de alta presión en la conservación de alimentos. En "Manual de conservación de alimentos". M. S. Rahman (ed). Acribia. Zaragoza.
- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, M. y Gilmour, A. (1995a). Effect of high pressure on vegetative pathogens. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, M. y Gilmour, A. (1995b) The sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. *J. Food Prot.*, 58, 542 – 529.
- Pontes, L., Fornells, L. A., Giongo, V., Araujo, J. R. V., Sepulveda, A., Villas-Boas, M., Bonafe, C. F. S., and Silva, J. L. (1997). Pressure inactivation of animal viruses: potential biotechnological applications. En "High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology". Ed. Heremans, K. 91-94. Leuven University Press, Leuven, Belgium.
- Reddy, N. R., Solomon, H. M., Fingerhut, G. A., Rhodehamel, E. J. y Balasubramanian, V. M. (1999) Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. *J. Food Saf.*, 19, 277 – 288.
- Reichert, J. E. (1987). Tratamiento térmico de los productos cárnicos. Acribia. Zaragoza.
- Ritz, M., Jugiau, F., Rama, F., Courcoux, P., Semenou, M. y Federighi, M. (2000) Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. *Food Microbiol.*, 17, 375 –382.
- Ritz, M., Tholozan, J., Federighi, M. y Pilet, M. F. (2002) Physiological damage of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure. *Food Microbiol.*, 79, 47 – 53.
- Rocourt, J. (1999). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. En: "Listeria, listeriosis and food safety". 2ª ed. Eds. E. T. Ryser y E. H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Rodriguez, J. J., Sepulveda, D. R., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. G. (2000). Combined effect of high hydrostatic pressure and water activity on *E. coli* inhibition. 2000 meeting of the Institute of Food Technologists. Dallas. Abstract 86H-5.
- Rovere, P. (1996) Prove di sterilizzazione a 15000 bar per ottenere la stabilita microbiologica ed enzimatica. *Ind Aliment.*, 35, 1062 - 1065.
- Rovere, P., Miglioli, L., Lonneborg, N. G., Sacaramuzza, N. y Gola., S. (1998) Modeling and calculation of the sterilising effect in high pressure heat treatments. *Ind. Conser.*, 73, 303 – 315.

- Sale, A. J. H., Gould, G. W. y Hamilton, W. A (1979). Inactivation of bacterial spores by hydrostatic pressure. *J. Gen. Microbiol.*, 60, 323 – 334.
- SCVPH (Scientific committee on veterinary measures relating to public health) (1999) Opinion on *Listeria monocytogenes*. Adopted on 23 September 1999.
- Shigehisa, T., Ohmori, T., Saito, A., Taji, S., y Hayashi, R. (1991) Effects of high pressure on the characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 12, 207 – 216.
- Silva, J. L. and Weber, G. (1988). Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *J. Mol. Biol.* 199, 149-159.
- Silva, J. L., Luan, P., Glaser, M., Voss, E. W., and Weber, G. (1992). Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. *J. Virol.* 66, 2111-2117.
- Simpson, R. K. y Gilmour, A. (1997a) The effect of high pressure on *Listeria monocytogenes* on phosphate buffered saline and model food systems. *J. Appl. Microbiol.* 83, 181 – 188.
- Simpson, R. K. y Gilmour, A. (1997b) The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods phosphate buffered saline and model food systems. *Food. Microbiol.*, 14, 567 – 573.
- Smelt, J. P. P. M. (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.*, 9, 152 – 158.
- Smelt, J. P. P. M, Rijke, A. G. F. y Hayhurst, A. (1994). Possible mechanism of high pressure inactivation of microorganisms. *High Press. Res.*, 12, 199 – 203.
- Sojka, B. y Ludwig, H. (1997). Effects of pressure changes on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *Pharm Ind.*, 59, 436 – 438.
- Sonoike, K., Setoyama, T., Kuma, y. Kobayashi, S. (1992). The effect of pressure and temperature on the death rates of *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli*. En "High Pressure and Biotechnology". Eds. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson. Jhon Libby and Co. London.
- Styles, M. F., Hoover, D. G. y Farkas, D. F. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.*, 56, 1404 – 1407.
- Tapiador, J. (2004) Comunicación personal.
- Tarr, P. I. (1994) Testimony to Washington State Senate. Department of Agriculture. January 20.
- Tay, A., Yousef, A. E., Shellhammer, T. H., Nienaber, U. y Chism, G.W. (2002) Variation in resistance of *Listeria monocytogenes* strains to high pressure processing. Annual Meeting and Food Expo. Anaheim. California http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_12757.htm
- Tewari, G., Jayas, D. S., and Holley, R.A. 1999. High pressure processing of foods: an overview. *Sci. Aliments* 19: 619-661.
- Tholozan, J. L.; Ritz, M.; Jugiau, F.; Federighi, M y Tissier, J. P. (2000) Physiological effects of high hydrostatic pressures treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *J. Appl Microbiol*, 88, 202 – 212.
- Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J. A, Sleator R. D., Gahan C. G. M., Hill, C. y Abee T. (2002). Multiple deletions of the dsMolte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. *Appl Environ. Microbiol.*, 68, 4710–4716.
- Wenger, J. D., Swaminathan, B., Hayes, P. S., Green, S. S., Pratt, M., Pinner, R.W., Schuchat, A. y Broome, C. V. (1990) *Listeria monocytogenes* contamination of turkey franks: evaluation of a production facility. *J. Food. Prot.*, 53, 1015 – 1019.
- WHO (World Health Organization) (1997). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections (WHO/FSF/FOS/97.6). Geneva. Food safety unit. Program of food safety and food aid. World Health Organization.
- Wilson, J. B., Clarke, R. C., Renwick, S. A., Rahn, K., Johnson, R. P., Karmali, M. A., Lior, H., Alves, D., Gyles, C. L., Sandhu, S., McEwen, S. A. y Spika, J. S. (1996) Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *J. Infect. Dis.*, 174, 1021- 1027.

- Wouters, P. C., Glaasker, E. y Smelt, J. P. P. M. (1998) Effects of high pressure inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 509 – 514.
- Yuste, J., Mor.Mur, M., Capellas, M. y Pla, R. y (1999) *Listeria innocua* and aerobic mesophiles during chill storage of inoculated mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure. *Meat Sci.*, 53, 251 – 257.
- Yuste, J., Capellas, M., Pla, R., Fung, D. Y. C. y Mor-Mur, M. 2001. High Pressure Processing for food safety and Preservation: A review. *J. Rap. Meth. Automat. Microbiol.* 9, 1-10.
- Zhao, T., Doyle, M. P., Shere, J. y Garber, L. (1995). Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in survey of dairy herd. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1290 – 1293.

Apéndice I

Manorresistencia aproximada de distintas bacterias de interés sanitario

Tabla 1.- Manorresistencia (log ciclos de reducción tras 15 min de tratamiento)

aproximada a 20-25°C de distintas bacterias de interés sanitario

| Bacteria | Medio | Presión (MPa) | | | | |
|--------------------------|--------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 |
| <i>L. monocytogenes</i> | Tampón | 0,4 | 1 | 4 - 7 | 6 - 9 | > 10 |
| | Matriz alimentaria | - | - | 1 - 3 | 3 - 6 | |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | Tampón | - | 1 | 2 - 4 | - | 6 - 8 |
| | Matriz alimentaria | - | | | 3 | > 5 |
| <i>Salmonella</i> spp | Tampón | - | 4 - 6 | 6 - 8 | > 10 | - |
| | Matriz alimentaria | - | 3 - 4 | 6 | - | - |
| <i>Y. enterocolitica</i> | Tampón | - | 6 | - | - | - |
| | Matriz alimentaria | - | 6 | - | - | - |
| <i>Staph. aureus</i> | Tampón | - | - | 5 | - | - |
| | Matriz alimentaria | - | - | 0,5 | 2 | 2 - 6 |
| <i>C. jejuni</i> | Tampón | - | 6 | - | - | - |
| <i>Pseudomonas</i> spp | - | - | > 6 | - | - | - |

Preparada con datos de Metrick y col., 1989; Patterson y col., 1995a; Shigesia y col., 1991; Styles y col., 1991; Simpson y Gilmour, 1997a; Simpson y Gilmour, 1997b; Smelt, 1998; Ritz y col., 2000; Alpas y col., 1999; Murano y col., 1999; Kalchayanand y col., 2001; Ritz y col., 2002; Shao y col., 2003.

Nota.- Los datos de esta tabla deben tomarse con precaución porque muestran la manorresistencia a temperaturas medias, próximas a las óptimas de crecimiento. Al desviarse de la temperaturas óptimas puede, en algunos casos, modificarse la manorresistencia significativamente.

Referencias

- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C. P. y Ray, B. (1999). Variation resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4248 - 4251.
- Kalchayanand, N., Ray, B., Sikes, T. y Dunne, C.P. (2001). Complete destruction of *Listeria monocytogenes* in hot dogs by hydrostatic pressure and bacteriocin-based biopreservatives. University of Wyoming Annual Science Research Report 2001.
- Metrick, C., Hoover, D. G. y Farkas, D. F. (1991). Effects of high hydrostatic pressure on heat resistance and heat sensitive strains of *Salmonella*. *J. Food Sci.*, **54**, 1547 - 1564.
- Murano, E. A., Murano, P. S., Brennan, R. E., Shenoy, K., Moreira, R. G. (1999) Application of high hydrostatic pressure to eliminate *Listeria monocytogenes* from fresh pork sausage. *J. Food Prot.*, **62**, 480 - 483.
- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, M. y Gilmour, A. (1995). Effect of high pressure on vegetative pathogens. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Shao, Y., Ramaswamy, H. S. y Smith, J. P. (2003) Kinetics of high pressure destruction of *E.coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in cheese. 2003 IFT Annual Meeting, Chicago.
http://ift.confex.com/ift/2003/techprogram/paper_18547.htm
- Shigeisa, T., Ohmori, T., Saito, A., Taji, S., y Hayashi, R. (1991) Effects of high pressure on the characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, **12**, 207 - 216.
- Simpson, R. K. y Gilmour, A. (1997a) The effect of high pressure on *Listeria monocytogenes* on phosphate buffered saline and model food systems. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 181 - 188.
- Simpson, R. K. y Gilmour, A. (1997b) The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods phosphate buffered saline and model food systems. *Food. Microbiol.*, **14**, 567 - 573.
- Smelt, J. P. P. M. (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.*, **9**, 152 - 158.
- Styles, M. F., Hoover, D. G. y Farkas, D. F. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.*, **56**, 1404 - 1407.

Consideraciones particulares acerca de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*.***Staphylococcus aureus*.**

El género *Staphylococcus* comprende una veintena de especies, muchas de las cuales contaminan los alimentos a partir de fuentes humanas, animales o ambientales. Sin embargo, *Staph. aureus* es patógeno para el hombre por vía digestiva, no por la ingestión de bacterias vivas sino merced a las enterotoxinas que producen durante su multiplicación en los alimentos contaminados. *Staph. aureus* es una bacteria ubicua, siendo el principal reservorio el hombre de tal forma que la persona colonizada es portadora de estafilococos, lo que supone una diseminación de los mismos a otros individuos o alimentos.

Uno de los aspectos más interesante de esta bacteria es el número de células que se requiere para producir enterotoxinas hasta niveles peligrosos. Es un aspecto que se ve influido por muchas variables (cepa, composición del alimento, temperatura, pH, Eh, a_w , presencia de inhibidores, etc.) y, por ello, no se puede ofrecer un número con precisión. A pesar de ello, hay unas pautas que son útiles para evaluar el riesgo. De acuerdo con la FDA se consigue una tasa efectiva de enterotoxinas cuando el número de células de *Staph. aureus* es superior a 10^5 g^{-1} (Jablonski y Bohach, 2001) aunque otros estudios (Holmberg y Blaque, 1984) consideran una tasa superior (entre 10^5 g^{-1} y 10^8 g^{-1}). De la misma forma, tampoco se conoce la cantidad de enterotoxina necesaria para que se presenten los síntomas pero se acepta generalmente que está comprendida entre 0,1 y 1 mg kg^{-1} (Everson y col., 1988).

Staph. aureus compite pobremente con otras bacterias y, en consecuencia, rara vez causa intoxicación alimentaria en los alimentos frescos siendo más frecuente en alimentos que se han cocinado y contaminado después que se han mantenido algunas horas entre 20–40 °C a una temperatura adecuada para su multiplicación. Entre ellos, pasteles de crema, carnes cocidas, mariscos y otros platos preparados con anticipación (Roberts, 1982). *Staph. aureus* se destruye fácilmente mediante la cocción pero no sus enterotoxinas.

Es una de las bacterias patógenas más resistente a bajas a_w , pudiendo permanecer viable por largos periodos en materiales deshidratados. Su osmotolerancia le permite crecer y producir toxinas a a_w de 0,86 (ICMSF, 1996). Crece óptimamente entre 37 y 40°C pero a 10°C presenta una larga fase de latencia, superior a 20 horas (Broughall y Brown, 1984) y cuando crece, lo hace lentamente, habiéndose descrito, a esa temperatura, valores g en condiciones ambientales normales (elevada a_w y pH próximo a la neutralidad) de 13,4–21,6 horas en leche (Broughall y Brown, 1984) y algo menores (4,9–5,7) en una mezcla de carne y riñón (ICMSF, 1996). Estos valores son más desfavorables si las condiciones del medio se combinan con otros factores disgenésicos. Además, las enterotoxinas se producen en un intervalo más estrecho de temperaturas. Por ejemplo, en jamón cocido se detecta la toxina en 2–3 días cuando se almacena entre 20 y 30°C pero a 10°C se prolonga el tiempo hasta más de 4 semanas e incluso, a veces, 16 semanas. (Genigeorgis y col., 1967).

***Escherichia coli* O157:H7.**

Escherichia coli es una especie de la familia *Enterobacteriaceae* que forma parte de la microbiota anaerobia normal del intestino humano y de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas, son pues, apatógenas. Sin embargo, algunas producen enfermedades diarreicas. Los serotipos difieren unos de otros en tres antígenos: el somático (O), el flagelar (H) y el de la cápsula (K). Los serotipos de mayor patogenicidad se agrupan de acuerdo con su virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos y diferencias entre los antígenos O:H. Estos grupos constan de *E. coli* enteropatógeno (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enteroinvasivo (EIEC), de adherencia difusa (DAEC), de agregación entérica (EAEC) y enterohemorrágico (EHEC). Este último es el que provoca la enfermedad más grave y a él pertenece el serotipo *E. coli* O157:H7. Se identificó por vez primera en 1982 (Wells y col., 1983). Este serotipo de la especie es muy peculiar, ya que no comparte las características comunes de otros *E. coli*. Entre ellas, no crece bien en los medios de cultivos normales y tampoco lo hace a 44,5 °C, no produce b-glucuronidasa y no fermenta el sorbitol (Doyle y Paddy, 1989). Porta un plásmido de 60 MDa. Los otros serotipos distintos al O157:H7 no comparten estas características pero sí tienen en común la producción de toxina Shiga (Griffin, 1995).

Al contrario que otros muchos patógenos, *E. coli* O157:H7 tolera ambientes ácidos, pudiendo multiplicarse a pH de 4,0 - 4,5 aunque esta peculiaridad depende de la interacción de pH con otros factores. Si *E. coli* O157:H7 está presente en números elevados, puede sobrevivir a la fermentación (p.e. en embutidos a pH de 4,5) durante al menos 2 meses (Leyer y col., 1995; Cheville y col., 1995), en mayonesa (pH entre 3,6 y 3,9) durante 5 - 7 semanas (Zhao y Doyle, 1994) y en zumo de manzana (pH 3,6 - 4,0) durante 10 - 31 días (Zhao y col., 1993) y puede sobrevivir a su paso por el estómago (Arnold y Kaspar, 1995). Esta ácido tolerancia se debe a tres sistemas inducidos: uno oxidativo, otro arginina dependiente y el tercero glutamato dependiente (Lin y col., 1996).

E. coli O157:H7 presenta, sin embargo, una termorresistencia similar a la de otros serotipos y normal de acuerdo con su carácter de Gram negativa, es decir, es bastante termolábil, con unos parámetros térmicos en carne similares (Doyle y Schoeni, 1984), o ligeramente menores (ICMSF, 1996), a los de *Salmonella* spp. (Goodfellow y Brown, 1987). De aquí, que los tratamientos térmicos aplicados para destruir las salmonelas sean también suficientes para eliminar *E. coli* O157:H7. Se han descrito valores D de 270, 45, 24 y 9,6 segundos a las temperaturas de 57,2; 60,0; 62,8 y 64,3°C, respectivamente (Doyle y Schoeni, 1984). La grasa presente en la carne protege contra la acción letal del calor pero, aún así, siguen siendo bastante termolábiles. Por ejemplo, en carne de vacuno picada con un 30% de grasa los valores D a 57,2 y 62,8°C pasan a ser, respectivamente, de 318 y 28 segundos (Line y col., 1991). En conclusión, puede decirse que no ha de preocupar las células supervivientes a un tratamiento térmico insuficiente pues el que se debería aplicar para otras bacterias más termorresistentes, por ejemplo, *L. monocytogenes*, es apto para reducir el número de *E. coli* O157:H7 hasta niveles estadísticamente despreciables.

Es muy sensible también a los medios con a_w ligeramente reducida. Cesa su crecimiento a valores de la a_w de alrededor de 0,95 (ICMSF, 1996).

El reservorio más importante de *E. coli* O157:H7 es el ganado vacuno donde su prevalencia es elevada, habiéndose detectado en el 36% de vacas y 57% de terneras de 80 cabezas analizadas en

Canadá (Wilson y col., 1996) y en el 3,2% de 191 terneras estudiadas en EEUU (Zhao y col., 1995). Además, se ha observado que la prevalencia es mayor en verano que en invierno, lo que se correlaciona con la incidencia de la enfermedad (Meng y col., 2001). Por ejemplo, en un estudio realizado en el Reino Unido en 1997 se observó que se detectaba *E. coli* O157:H7 en el 38% de las vacas dispuestas para el sacrificio en primavera mientras que, entre los animales sacrificados en invierno, sólo en el 4,8% se detectó la bacteria (Meng y col., 2001). Aunque de forma general se considera que el ganado vacuno es el principal reservorio, también se han detectado en otros animales de abasto, domésticos y silvestres, como ovejas, cabras, cerdo, caballo, perros, gatos, ratas, ciervo, gaviota, etc. (Chapman, 2000) e incluso en cebú (Kaddu-Mulindwa y col., 2001). De estas fuentes, la más importante es la oveja, cuya prevalencia se aproxima a la del ganado vacuno, habiéndose descrito prevalencias del 31% en Junio, 5,7% en Agosto y 0% en Noviembre (Kudva y col., 1996).

E. coli O157:H7 es la bacteria causante de una grave enfermedad que cursa con colitis hemorrágica, dolores abdominales, síndrome urémico hemolítico (HUS) que se manifiesta con diarrea sangui-nolenta, nefropatía aguda, postración, coma y muerte. Al menos 30 países de los 5 continentes han detectado la enfermedad con una tendencia creciente aunque ello quizás se deba, al menos en parte, a una mayor vigilancia por parte de las autoridades sanitarias y a una mejora de los medios de detección del microorganismo. En EEUU por ejemplo, se denunciaron 2 brotes en 1982, 17 en 1992, 2 en 1996 y 42 en 1998. No obstante, muchos enfermos con síntomas leves (diarreas suaves y no hemorrágicas) no prestan excesiva atención a la enfermedad y tales casos no se registran. Los informes FoodNet indican que en EEUU se presentaron anualmente entre 2,1 y 2,8 casos por cada 100.000 habitantes en el periodo 1996 – 1999 (CDCP, 2000), estimándose una incidencia anual que abarcó a 73.480 enfermos con 61 muertes (Mead y col., 1999) de los cuales el 85% se atribuyen a transmisión alimentaria (Meng y col., 2001). El mayor brote que se ha producido a nivel mundial fue en Japón en 1996 por consumo de brotes de rábano, en el que se vieron afectadas 11.000 personas (Michino y col., 1998) y el caso con mayor número de muertes se produjo en Escocia por el consumo de carne cocida, donde murieron 21 personas de las 501 afectadas (Ahmed y Donaghy, 1998).

Los recuentos realizados en los alimentos causantes de brotes de enfermedad han revelado que el número de células necesario para que se produzca la enfermedad es muy bajo. En todos los casos se han detectado entre 0,3 y 15 células g^{-1} de producto (FSIS, 1993; Nauta y col., 2001). Por ello, se acepta de forma general que la dosis infectiva es menos de 100 células (ICMSF, 2002). Esta dosis es más baja (probablemente unas 10 células) en individuos especialmente susceptibles, como inmunocomprometidos, ancianos, niños, etc. (Meng y col., 2001; ICMSF, 2002). Por ejemplo, en niños se ha estimado que el riesgo es 2,5 veces superior que el de los adultos (FSIS, 2002).

E. coli O157:H7 se ha detectado en la carne procedente de los diferentes animales de abasto aunque la prevalencia en la de unos y otros es diferente. La prevalencia en la carne picada de vacuno y ovino llega hasta el 6% mientras que en la carne de cerdo y de ave es menor, habiéndose observado, respectivamente, valores del 1,5% y 4% (SCVPH, 2003). Como el tracto intestinal de estos animales, principalmente el del ganado vacuno, es el reservorio natural, la contaminación de la carne, mataderos e industrias se produce durante el sacrificio, primero la canal y de aquí, mediante las operaciones posteriores de carnización, las bacterias pasan a los cortes que se practican para su comercialización.

De acuerdo con este modelo de contaminación, puede deducirse que la localización de las bacterias es superficial en las piezas cárnicas, incluidos los filetes domésticos. Sin embargo, en algunos productos, como la carne picada y las hamburguesas, los microorganismos están distribuidos también en el espesor de la pieza. Realmente, son las hamburguesas cocinadas insuficientemente (infracalentadas) la causa común de los brotes de *E. coli* O157:H7 que se han producido en EEUU (Meng y col., 1991; Anónimo, 1993). Hay que añadir, además, la posibilidad de contaminaciones cruzadas a otros alimentos; entre ellos los listos para su consumo (RTE: "ready-to-eat") en cocinas y establecimientos de suministro a la población y de servicios colectivos (ICMSF, 2002). La carne y muchos productos cárnicos tanto a nivel doméstico como industrial se someten a tratamiento térmico para, respectivamente, su consumo en el hogar, comedores colectivos, restaurantes, etc. o para su distribución a la población en ultramarinos, supermercados, etc., lo que conlleva que, si se produce una contaminación, el número de células será siempre más bajo que en las hamburguesas. Otros productos no sufren tratamiento térmico alguno. Tal es el caso de los embutidos fermentados. En EEUU se han asociado algunos brotes de *E. coli* O157:H7 al consumo de "summer sausages" (CDCP, 1994), lo que se ha explicado teniendo en cuenta la tolerancia de *E. coli* O157:H7 a los bajos pH pero se ha demostrado experimentalmente que concentraciones de nitrito de 200 mg ml⁻¹ inhiben totalmente el crecimiento de la bacteria (Tsai y Chou, 1996) y, por otra parte, la a_w (< 0,92) de los embutidos madurados impide el crecimiento de *E. coli* O157:H7, ya que 0,95 es el valor mínimo para su multiplicación (ICMSF, 1996). Puede decirse, pues, que son las hamburguesas y productos similares los derivados cárnicos que más preocupan en relación con la presencia de *E. coli* O157:H7. Siempre hay que suponer que en ocasiones se cocinen aplicando un tratamiento térmico insuficiente.

Listeria monocytogenes.

Aunque *L. monocytogenes* se describió hace cerca de 80 años (Murray y col., 1926) y se conocía la listeriosis, la enfermedad transmitida por los alimentos, sin embargo, no adquirió importancia hasta las últimas dos décadas, a raíz del brote que se produjo en Nueva Escocia en 1981 por el consumo de ensalada de repollo, identificándose la contaminación de la hortaliza con estiércol de oveja (Schlech y col., 1983). Es una enfermedad grave que cursa con meningitis, meningocelalitis, septicemia y abortos, con una mortalidad del 20 – 30% (McLauchlin, 1996, 1997; Rocourt, 1996).

El género *Listeria* consta de 6 especies, de las cuales sólo se considera patógena para los humanos, *L. monocytogenes* aunque *L. ivanovii* es patógena también para ciertos animales, de acuerdo con su LD₅₀ en ratón (Swaminathan, 2001).

L. monocytogenes se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y resiste bastante bien las condiciones ambientales adversas, incluidas un bajo pH (hasta 4,4) y relativamente elevadas concentraciones de NaCl (10 – 12%). Es anaerobio facultativo y psicrotrofo. Puede multiplicarse entre 0 y 45°C, con unos valores *g* y fases de latencia de, respectivamente, 43, 6,6 y 1,1 horas y 151, 48 y 7,3 horas a 4, 10 y 37°C (Barbosa y col., 1994). Se puede encontrar en superficies húmedas de los equipos industriales, lo que, unido a su facultad de multiplicarse en refrigeración, refleja su presencia en frigoríficos y unidades de refrigeración (ICMSF, 1996). Puede multiplicarse entre valores del pH de 4,4 y 9,6 (Lou y Yousef, 1999). La a_w óptima de crecimiento es de 0,97 y la mínima de 0,90 - 0,93 (Miller,

1992; Farber y col., 1992) pero puede sobrevivir durante largos periodos a niveles de a_w del orden de 0,83 (Swaminathan, 2001). Estas circunstancias hacen que sea casi imposible conseguir un alimento fresco libre de *L. monocytogenes*. De hecho, se han asociado brotes de listeriosis a diversos alimentos. Entre ellos, quesos blandos (Azadian y col., 1989; Bannister, 1987; Linnan y col., 1988), leche pasteurizada contaminada post-proceso (Fleming y col., 1985), productos cárnicos (Goulet y col., 1993; Jacket y col., 1995), pescado crudo y marisco (Lennon y col., 1984; Riedo y col., 1994), paté (McLauchlin y col., 1991; Kittson, 1992), ensalada de repollo (Schlech y col., 1983) y de arroz (Salamina y col., 1996) y diferentes alimentos RTE (Kerr y col., 1988; Schwartz y col., 1988; Gilbert y col., 1989; Kaczmarek y Jones, 1989; Kerr y col., 1990). No obstante, la aplicación eficaz del sistema APPCC desde la granja al consumidor minimiza el riesgo de enfermedad alimentaria (ICMSF, 1996, 2002).

Los brotes de listeriosis que se han presentado y las investigaciones epidemiológicas han permitido deducir que los alimentos RTE son de alto riesgo para los individuos susceptibles. Muchos de estos alimentos se someten a un tratamiento térmico medio y, normalmente, todos ellos se manipulan extensamente antes de su envasado, pudiéndose contaminar en esta etapa (Kalchayanand y col., 2001). El producto final, se conserva habitualmente bajo refrigeración, ofreciendo una gran oportunidad a *L. monocytogenes* para su multiplicación durante su almacenamiento en la industria, transporte y distribución, exposición en supermercados y, finalmente, en los frigoríficos domésticos. Entre los productos de esta naturaleza están los preparados con leche sin pasteurizar, quesos blandos, etc. y entre los derivados cárnicos, salchichas frankfurt y similares, pastelitos, empanadas, canapés, etc. que contienen carne e ingredientes de origen marino. Estas circunstancias han llevado a algunos países, como Canadá, a que estos alimentos se incluyan como productos de inspección obligatoria, dándole prioridad a los que han originado brotes de listeriosis o a aquellos de vida útil superior a 10 días (Farber, 2000).

En relación con la carne y productos cárnicos, cabe decir que diversos productos RTE cocidos preparados con carne de aves y mamíferos han sido la causa de diversos brotes de listeriosis en Norte América y Europa (Swaminathan, 2001), siendo el caso más grave el ocurrido en Francia en 1992 por el consumo de lengua de cerdo en gelatina en el que se vieron afectadas 279 personas con 85 muertes (Jacket y col., 1995). En EEUU se ha identificado como un factor de riesgo para la presentación de listeriosis alimentaria a frankfurters consumidas sin calentar y a la carne de pollo calentada insuficientemente durante el cocinado (Schwartz y col., 1989). La potencial multiplicación de *L. monocytogenes* en la carne depende del tipo de carne (en la de aves crece mejor que en otras), del pH de la misma y el tipo de población bacteriana de la microbiota competitiva. La contaminación del músculo puede producirse por portadores sintomáticos o asintomáticos a partir del animal después del sacrificio.

L. monocytogenes no se multiplica normalmente durante la fermentación de los embutidos pero con frecuencia se detectan células viables en tasas muy bajas algunas semanas después de que ha finalizado el proceso fermentativo (Truessel y Jemmi, 1989).

Aunque *L. monocytogenes* presenta, entre las bacterias vegetativas, una considerable termorresistencia, no es tan elevada como la de *M. tuberculosis* y, por tanto, se destruye con los tratamientos pasteurizantes aplicados a la leche (72 °C, 15 segundos) aunque se ha informado que en salami y

grasa aumenta su resistencia frente al calor (Fain y col., 1991). Se han ofrecido valores D a 52 °C y 70°C de 100 y 179 minutos y 0,13 y 0,11 minutos en pechuga y muslo de pollo, respectivamente (Mackey y col., 1989); a 54,4°C y 57,2°C de 20 y 6,6 – 9-8 minutos, respectivamente en embutidos fermentados (Schoeni y col., 1991); a 60 °C de 3,1 minutos en carne picada (Bradshaw y col., 1985); a 62 °C, 64°C, 66°C y 70°C de 2,2 – 2,5, 1,5 – 1,8, 0,68 – 0,95 y 0,16 – 0,20 minutos, respectivamente, en un homogeneizado de pollo (Gaze y col., 1989) e incluso, partiendo de una tasa de 2×10^5 células, se han detectado listerias en muslo de pollo tras un tratamiento a 82,2 °C después de un almacenamiento de 4 semanas bajo refrigeración (Carpenter y Harrison, 1989). Como se podría esperar, la presencia de solutos (a_w reducida) aumenta la termoresistencia (Summer y col., 1991; Miller, 1992) y el pH subóptimo para el crecimiento la disminuye (Beuchat y col., 1986).

La incidencia de *L. monocytogenes* en la carne fresca es muy elevada. Por ejemplo, se ha informado que en el Reino Unido el 60% de la carne de pollo vendida al detalle contiene *L. monocytogenes* (Pini y Gilbert, 1988; Petran y Swanson, 1993.) y en Irlanda se ha detectado *Listeria* spp. en el 97% de las más de un centenar de hamburguesas congeladas que se analizaron (Sheridan y col., 1994). En este mismo estudio se observó que no se detectaban listerias en las salchichas que se pre-ensararon y cocieron en la industria pero sí en el 21% del producto cocido que se vendía al detalle sin envasar tras el tratamiento térmico, lo que refleja una contaminación post-proceso. La incidencia en EEUU durante el periodo 1993 – 1996 fue de 0 – 2,2% en pastelitos de carne de vacuno; 1,0 - 5,3% en salchichas tipo frankfurt cocidas; 2,2 – 4,67% en salsas para untar y ensaladas y de 5,1 – 81% en jamón y fiambres cocido loncheados (Swaminathan, 2001). En un estudio realizado desde 1992 a 1995 en mataderos belgas y franceses, siempre se detectó *L. monocytogenes* (>1 u.f.c. 100 cm^{-2} o 25 g) en productos avícolas aunque el porcentaje fue reduciéndose en ese periodo desde el 32,1% en 1992 y 27,2% en 1993 hasta el 3,6% y 2,1% en 1994 y 1995, respectivamente (Uyttendaele y col., 1997). Además, en ese mismo estudio se observó que el 50% de las canales (de las aves) eran portadoras de listerias tras el escaldado. De forma similar, la incidencia de *L. monocytogenes* en alimentos cocidos RTE preparados con carne se ha reducido bastante en Canadá donde a partir de 1888 se estableció un plan de vigilancia, pasando del 24% en 1989 – 1990 hasta el 3% en 1991 – 1992 (Farber y Peterkin, 1999).

No se sabe cual es la dosis infectiva aunque ésta depende del estado inmunológico del hospedador. Los experimentos con humanos no pueden realizarse debido a la gravedad de la enfermedad y los estudios en ratas y otros animales de experimentación no son extrapolables al hombre. Sin embargo, los datos publicados indican que la población de *L. monocytogenes* en alimentos causantes de casos epidémicos y esporádicos de brotes es, habitualmente, superior a $100 \text{ u.f.c. g}^{-1}$ (SCVPH, 1999), entre 10^2 y 10^6 (ICMSF, 2002). Por ejemplo, en el que se produjo en Francia en 1992 por el consumo de lengua de cerdo en gelatina, el producto de envases sin abrir contenía una carga de listerias de 10^4 – 10^6 células g^{-1} (McLauchlin, 1996). No obstante, un brote que afectó a 4 individuos por el consumo de mejillones ahumados contenían $1,6 \times 10^7$ u.f.c. g^{-1} (Mitchell y col., 1991). En cualquier caso, no se puede confiar totalmente en los datos publicados porque el número de bacterias puede haber aumentado, o disminuido, entre el consumo y el análisis. En cualquier caso, la baja incidencia de listeriosis en los humanos (2 – 6 casos por millón de individuos –Mead y col., 1999-) sustenta la opinión de que la dosis infectiva es baja (Notermans y col., 1998; SCVPH, 1999).

Referencias

- Anónimo (1993) Cross-contamination/different strain in Oregon *E. coli* case. *Food Chem. News*, 35, 32 – 33.
- Ahmed, S. y Donaghy, M. (1998). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in central Scotland. En " *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains" Eds.: J. Kaper y O'Brien. ASM. Press. Washington D.C.
- Arnold, K. W. y Kaspar, C.W. (1995) Starvation and stationary phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2037 – 2039.
- Azadian, B. S., Finnerty, G. T. y Pearson, A. D. (1989). Cheese borne listeria meningitis in immunocompetent patient. *Lancet* i, 132 – 323.
- Barbosa, W. B., Cabedo, L., Wederquist, H. J., Sofos, J. N. y Schmidt, G. R. (1994). Growth variation among species and strains of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 57, 765 – 769.
- Beuchat, L. R., Brackett, R.E., Hao, D. Y. Y. y Conner, D. E. (1986) Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. *Can. J. Microbiol.*, 32, 791 – 795.
- Bradshaw, J. G., Peeler, J. T., Corwin, J. J., Hunt, J. M., Tierney, J. T., Larkin, E. P. y Twedt, R. M. (1985) Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *J. Food Prot.*, 48, 743 - 745
- Broughall, J. M. y Brown, C. (1984). Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development and application of three dimensional models to predict bacterial growth. *Food Microbiol.*, 1, 13 – 22.
- Carpenter, S.L. y Harrison, M.A. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* on processed poultry. *J. Food Sci.*, 54, 556 – 557.
- CDCP (Centers for Diseases Control and Prevention) (1994). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry cured salami in Washington and California 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 44, 157 – 160.
- CDCP (Centers for Diseases Control and Prevention) (2000). *Preliminary FoodNet data on the incidence of food-borne illness-selected sites, United States, 1999. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49, 2001 – 2005.
- Chapman, P.A. (2000) Sources of *Escherichia coli* O157 and experiences over the 15 years in Sheffield, UK. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement*, 88, 515 – 605.
- Chevillat, A. M., Arnold, K. W., Buchreiser, C. y Kaspar, C. W. (1995). *RpoS* regulation of acid, heat, salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1822 – 1824.
- Doyle, M. P. y Schoeni, J. L. (1984). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated to hemorrhagic colitis. *Applied Environ. Microbiol.*, 48, 855 – 856.
- Doyle, M. P. y Padhye, V. V. (1989). *Escherichia coli*. En " *Foodborne bacterial pathogens*" Ed. M. P. Marcel Dekker. New York.
- Everson, M. L., Hinds, M. W., Bernstein, R. S. y Bergdoll, M. S. (1988). Estimation of human doses of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* 7, 311- 316.
- Fain, A. R., Line, J. E., Moran, A. B., Martin, L. M., Lechowich, R. V., Carosella, J. M. y Brown, W. L. (1991) Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D-value and z- value determinations in ground beef and turkey. *J. Food Prot.*, 54, 756 – 761.
- Farber, J. M. (2000). Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood products. *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 247 – 251.
- Farber, J. M., Coates, F. y Daley, E. (1992). Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 103 –105.
- Farber, J. M. y Peterkin, P. I. (1999). Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. En: " *Listeria, listeriosis and food safety*". 2ª ed. Eds. E. T. Ryser y E. H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, L., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V. y Reingold, A. L. (1985). Pasteurized milk as vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Engl. J. Med.* 312, 404 – 407.

- FSIS (Food Safety and Inspection Service) (1993) Report on the *E. coli* O157:H7 outbreak in the Western State. May 21, 1993. Food Safety and Inspection Service, USDA.
- FSIS (Food Safety and Inspection Service) (2002) Draft risk assessment of the public health impact of on the *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef.
<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/00-023N/00-023NReport.pdf>
- Gaze, J. E., Brown, G. D., Gaskell, D. R. y Banks, J. G. (1989). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in homogenate of chicken, beef steak and carrot. *Food Microbiol.*, 6, 251 – 259.
- Genigeorgis, S. C., Riemann, H. y Sadler, W.W. (1967). Production of enterotoxin B in cured meats. *J. Food Sci.*, 34, 62 - 68.
- Gilbert, R. J., Mileer, K. L. y Roberts, D. (1989). *Listeria monocytogenes* and chilled foods. *Lancet* i, 383 – 384.
- Goodfellow, S.J. y Brown, W.L. (1978) Fate of *Salmonella* inoculated into beef for cooking. *J. Food Prot.* 41, 598 – 605.
- Goulet, V., Lepoutre, A. y Rocourt, J., Courtieu, A. L., Dehaumont, P. and Veit, P. (1993). Epidémie de listériose en France: Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. *Bull. Epidem. Hebdomadaire* 4, 13 – 14.
- Griffin, P. M. (1995). *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. En: "Infection of gastrointestinal tract" Raven Press. New York.
- Holmberg, S. D. y Blake, P. A. (1984). Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and olds misconceptions. *J. Amer. Med. Assoc.* 251, 487 – 489.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (1996). Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. 299 – 333. Chapman & Hall. London.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (2002). Microorganisms in foods 7. Microbiological testing in food safety management 313 – 332. Kluwe Academic Plenum Publishers & Hall. New York.
- Jablonski, L. M. y Bohach, G. A. (2001). *Staphylococcus aureus*. En: "Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers" 2ªed. Eds. M.P. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville. ASM Press. Washington D.C.
- Jacket, C., Catimel, B., Brosch, R., Buchrieser, C., Dehaumont, P., Goulet, V., Lepoutre, V. y Rocourt, J. (1995). Investigation related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2242 – 2246.
- Kaczmarek, E. B. y Jones, D. M. (1989). Listeriosis and ready-cooked chicken. *Lancet* i, 549.
- Kaddu-Mulindwa, D., Aisu, T., Gleier, K., Zimmermann, S. y Veutin, L. (2001). Occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faecal samples from children with diarrhoea and from healthy zebu cattle in Uganda. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 95- 101.
- Kalchayanand, N., Ray, B., Sikes, T. y Dunne, C.P. (2001). Complete destruction of *Listeria monocytogenes* in hot dogs by hydrostatic pressure and bacteriocin-based biopreservatives. University of Wyoming Annual Science Research Report 2001.
- Kerr, K. G., Dealler, S. F., y Lacey, R. W. (1988). *Listeria* ion cook-chill foods. *Lancet*, 332, 37 – 38.
- Kerr, K. G., Rotowa, N. A., Hawkey, P. M. y Lacey, R. W. (1990). Incidence of *Listeria* spp. in precooked chilled products by determined by culture and enzyme-linked immunoassay (ELISA). *J. Food Prot.*, 53, 606 – 607.
- Kittson, E. (1992). A case cluster of listeriosis in Western Australia with links to paté consumption. Procc. 11th Intern Symp. "Problem of listeriosis" 39 – 40. Copenhagen.
- Kudva, I. T., Hatfield, P. G. y Hovde, C. J. (1996). *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora dof sheep. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 431 – 433.
- Lennon, D., Lewis, B., Mantell, C. (1984). Epidemic perinatal listeriosis. *Ped. Infec. Dis.*, 3, 30 – 34.
- Leyer, G. J., Wang, L. L. y Johnson, E.A. (1995). Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3752 – 3755.
- Lin, J., Smith, M., Chapin, K., Baie, H., Bennet, G. y Foster, J. (1996) Mechanism of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3094 – 3100.

- Line, J., Fain, A., Moran, A., Martin, L., Lechowich, R., Carosella, J. y Brown, W. (1991). Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-values and z-values determination in ground beef. *J. Food Prot.* 54, 762 – 766.
- Linnan, M., Mascola, L., Low, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D., Yonekura, L., Hayes, P., Weaver, R., Andurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L. Kleks, A. y Broome, C. V. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New Engl. J. Med.*, 319, 823 – 828.
- Lou, Y. y Yousef, A. E. (1999) Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. En: "Listeria, listeriosis and food safety". 2ª ed. Eds. E.T Ryser y E.H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Mackey, B. M., Pritchett, C., Norris, A. and Mead, G. C. (1989). Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. *Lett. Appl. Microbiol.*, 10, 251 – 255.
- McLauchlin, J. (1996). The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, 7, 187 – 193.
- McLauchlin, J. (1997). The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective. *Med. Microbiol.*, 8, 1 - 14.
- McLauchlin, J., Hall, S. M., Velami, S. K. y Gilbert, R. J. (1991). Human listeriosis and paté: a possible association. *Br. Med. J.*, 303, 773 – 775.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1999) Food related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607 – 625.
- Meng, J., Doyle, M., Zhao, T. y Zhao, S. (2001). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. En: "Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers" 2ªed. Eds. M. P. Doyle, L. R. Beuchat y T. J. Montville. ASM Press. Washington D.C.
- Michino, H., Araki, K., Minami, S., Nakayama, T., Ejima, Y., Hiroe, K., Tanaka, H., Fujita, N., Usami, S., Yonekawa, M., Sadamoto, K., Tayaka, S. y Sakai, N. (1998). Recent outbreak of infectiousns caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. En " *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains" Eds.: J. Kaper y O'Brien. ASM. Press. Washington D.C.
- Miller, A. J. (1992). Combined water activity and solutes effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.*, 55, 414 – 418.
- Mitchell, D. L., Misrachi, A., Watson, A. J. y Colemna, D. (1991) A case cluster of listeriosis in Tasmania. *Listeria* in smoked mussels in Tasmania. *Comm. Dis. Intell.* 15, 427.
- Murray, E. G. D., Webb, R. A. y Swarn, M. B. R. (1926). A disease in rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.*, 29, 407 - 439.
- Nauta, M., Evers, E., Takumi, K. y Havalaaar, A. (2001) Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 in steak tartare in the Netherlands. Report 25781003/2001. ROVM. Bilthoven. The Netherlands.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P. y Chackraborty, T. (1998). Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 61, 244 – 248.
- Petran, R. L. y Swanson, K. M. J. (1993). Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *J. Food Prot.*, 56, 616 – 618.
- Pini, P. N. y Gilbert, R. J. (1988). The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chicken and soft cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, 6, 317 – 326.
- Rocourt, J. (1999). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. En: "Listeria, listeriosis and food safety". 2ª ed. Eds. E. T. Ryser y E. H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Roberts, D. (1982). Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970 – 79. *J. Hyg.*, (Cambridge) 89, 491-498.
- Salamina, G., Dalle Donne, E., Niccolini, A., Poda, G., Cesaroni, D., Bucci, M., Fini, R., Maldini, M., Schuchat, A., Swaminthan, B., Bibb, W., Rocourt, J., Binkin, N. y Salmaso, S. (1996). A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiol. Infect.*, 117, 429 – 436.
- Schlech, W. F., Lavinge, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E.,

- King, S. H., Nicholls, E. S. y Broome, C. V. (1983). Epidemic listeriosis. Evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.*, 308, 203 – 206.
- Schoeni, J. L., Brunner, K. G. y Doyle, M. P. (1991). Rates of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beef and fermented beaker sausage. *J. Food. Prot.*, 54, 334 – 337.
- Schwartz, B., Broome, C.V., Brown, G. R., Hightower, A. W., Ciesielski, C. A., Gaventa, S., Gellin, B. C. y Mascola, L. (1988). Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. *Lancet* 2, 779 – 782.
- Schwartz, B., Hexter, D., Broome, C., Brown, G.R., Hightower, A., Hirschorn, R., Porter, J., Hayes, P., Bibb, W., Lorber, B y Faris, D. (1989) Investigation of an outbreak of listeriosis: new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. *J. Infect. Dis.*, 159, 680 – 685.
- SCVPH (Scientific committee on veterinary measures relating to public health) (1999) Opinion on *Listeria monocytogenes*. Adopted on 23 September 1999.
- SCVPH (Scientific committee on veterinary measures relating to public health) (2003) Opinion on verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 (VTEC) in foodstuffs. Adopted on 21 – 22 January 2003.
- Sheridan, J. J., Duffy, G., McDowell, D. A. y Blair, I. S. (1994). The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products. *Int. J. Food Microbiol.*, 22, 105 – 113.
- Summer, S. S., Sandros, T. M., Harmon, M. C., Scott, V. N. y Bernard, D. T. (1991) Heat resistance of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *J. Food Sci.*, 56, 1741 – 1743.
- Swaminathan, B (2001). *Listeria monocytogenes*. En: "Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers" 2ªed. Eds. M. P. Doyle, L. R. Beuchat y T. J. Montville. ASM Press. Washington D.C.
- Truessel, M. y Jemmi, T. (1989). Der verhalten von *Listeria monocytogenes* waehrend der reifung und lagerung von kuenstlich kontaminierter salami und mettwurst. *Fleischwirtschaft* 69, 1586 – 1592.
- Tsai, S. y Chou, C. (1996) Injury, inhibition and inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by potassium sorbate and sodium nitrite as affected by pH and temperature. *J. Sci. Food Agric.*, 71, 10 – 12.
- Uyttendaele, M. R., Neyts, K. D., Lips, R. M. y Debevere, J. M. (1997). Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products obtained from Belgian and French abattoirs. *Food Microbiol.*, 14, 339 – 345.
- Wells, J. G., Davis, B. R., Wachsmuth, I. K., Riley, I. W., Remis, R. S., Sokolow, R. y Morris, G. K. (1983). Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.*, 18, 512 – 520.
- Wilson, J. B., Clarke, R. C., Renwick, S. A., Rahn, K., Johnson, R. P., Karmali, M. A., Lior, H., Alves, D., Gyles, C. L., Sandhu, S., McEwen, S. A. y Spika, J. S. (1996) Vero cytotoxicogenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *J. Infect. Dis.*, 174, 1021- 1027.
- Zhao, T. y Doyle, M. (1994). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *J. Food Prot.*, 57, 780 – 783.
- Zhao, T., Doyle, M., y Besser (1993). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservative. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2526 - 2530.
- Zhao, T., Doyle, M. P., Shere, J. y Garber, L. (1995). Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in survey of dairy herd. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1290 – 1293.



MINISTERIO
DE SANIDAD
Y CONSUMO



agencia
española de
seguridad
alimentaria