

revista del
Comité
Científico de la aesan

Nº 12

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



Revista del Comité Científico de la AESAN

Madrid, 2010

revista del
Comité
Científico de la asesan

Nº 12

Nota del Comité Editorial

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

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

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

Revista del Comité Científico de la AESAN

Consejo Editorial

Presidenta de Honor

Trinidad Jiménez García-Herrera

Editores Jefe

Roberto Sabrido Bermúdez

Ana María Troncoso González

Secretario del Comité Científico y editor

Jesús Campos Amado

Coeditores

Milagros Nieto Martínez

Rosa Sanchidrián Fernández

Octavio Rivera Atienza

Consejo Editorial Científico

Presidente del Comité Científico

Andreu Palou Oliver

Vicepresidente del Comité Científico

Juan José Badiola Díez

Arturo Anadón Navarro

Albert Bosch Navarro

Juan Francisco Cacho Palomar

Ana María Cameán Fernández

Alberto Cepeda Sáez

Lucas Domínguez Rodríguez

Rosaura Farré Rovira

Manuela Juárez Iglesias

Francisco Martín Bermudo

Manuel Martín Esteban

Albert Más Barón

Teresa Ortega Hernández-Agero

Andrés Otero Carballeira

Perfecto Paseiro Losada

Daniel Ramón Vidal

Elías Rodríguez Ferri

M^a Carmen Vidal Carou

Gonzalo Zurera Cosano

Coordinadores de la edición

Ricardo López Rodríguez

Vicente Calderón Pascual

Responsables de Comunicación de la AESAN

Juan Julián García Gómez

Héctor Alonso Martín

AESAN: Alcalá, 56. 28071. Madrid

Diseño y maquetación

Montserrat Gómez

NIPO: 845-10-002-3

ISSN: 1885-6586

D.L.: M-27353-2005

Correo electrónico: sgccaesan@msps.es

Imprime

Artegraf



Fuentes Mixtas

Grupo de producto de bosques bien gestionados y otras fuentes controladas.
www.fsc.org Cert no. SCS-COC-003973
© 1996 Forest Stewardship Council

Índice

Prólogo	7
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre los criterios microbiológicos para las especies patógenas del género <i>Vibrio</i> aplicables, como medidas adicionales de control en los puntos de inspección fronterizos, a productos pesqueros importados	9
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria	37
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con la enfermedad celíaca y los problemas que plantean las técnicas analíticas para el control del contenido de gluten en los alimentos	63
Líneas directrices de la documentación precisa para la evaluación de coadyuvantes tecnológicos que se pretenden emplear en la alimentación humana	79
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el riesgo asociado a la presencia de ácidos grasos <i>trans</i> en alimentos	95
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre las directrices generales respecto a las condiciones que deben cumplir los materiales poliméricos de envasado de alimentos para ser sometidos a radiaciones ionizantes	115

Son muy diversos los factores y situaciones que pueden contribuir a la ruptura o disminución de la seguridad en la alimentación, dando lugar a la aparición de reacciones adversas. Un ejemplo es la acción o presencia de sustancias y agentes externos vehiculados por el alimento, bien de forma accidental o bien añadidos intencionadamente. Otras posibilidades son las modificaciones del propio alimento, durante su manipulación a distintos niveles, o la capacidad nosogénica de algunos de sus componentes. Igualmente estas reacciones adversas pueden producirse no por factores propios del alimento, sino por una respuesta anómala de hipersensibilidad de algunos individuos ante determinados alimentos, como son las alergias e intolerancias alimentarias.

En su prevención es necesaria la intervención de diversos agentes sociales, que van desde el propio individuo y su entorno inmediato, hasta la administración sanitaria, pasando por fabricantes, transportistas, distribuidores y manipuladores de alimentos.

Los informes que aparecen en este número de la Revista del Comité Científico son buenos ejemplos de esta problemática, con la valoración de su situación actual y de las posibilidades de actuación en su prevención.

En el informe sobre los criterios microbiológicos aplicables para las especies patógenas del género *Vibrio* se valora la importancia que pueden tener las especies de este género en la contaminación de productos pesqueros y como, a pesar del escaso riesgo que existe en nuestro país, es necesario mantener un control estricto por parte de las autoridades sanitarias.

Otro ejemplo de contaminación de los alimentos por microorganismos es la formación de biofilms, estructuras bacterianas complejas, cuyo control y eliminación puede ser difícil. En su resolución debe estar involucrada principalmente la industria alimentaria. Su importancia y la necesidad de un conocimiento más profundo también se analizan en uno de los informes de este número.

En otras ocasiones, la posibilidad de una reacción adversa viene dada por sustancias añadidas intencionadamente a los alimentos. La incorporación de coadyuvantes tecnológicos en la transformación de alimentos o sus ingredientes es necesaria en muchas ocasiones, pero puede dar lugar a la presencia involuntaria de residuos de la propia sustancia o sus derivados, los cuales no deben presentar riesgo alguno para la salud. En este informe se precisan cuáles son los datos necesarios para evaluar la seguridad de dichos coadyuvantes, especialmente en los aspectos de sus posibles riesgos toxicológicos, carcinogénicos o alergológicos.

Una posible modificación, por contaminación externa, de los alimentos es su irradiación, con el consiguiente paso de productos de radiolisis desde los envases al alimento. Este hecho implica que es necesario controlar qué productos se liberan y cuál puede ser su efecto, como base al establecimiento de una legislación apropiada que proteja al consumidor. En este informe se recomienda un estudio previo de los materiales que vayan a ser irradiados, en el que se demuestre que estos productos de

radiolisis que pasan a los alimentos no sean nocivos para el consumidor, así como el establecimiento de una reglamentación específica.

Por otro lado, determinados componentes del propio alimento pueden poner en peligro la salud del consumidor. En este sentido, se presenta un detallado informe sobre el consumo de ácidos grasos saturados y ácidos grasos *trans*, cuya relación con el desarrollo de determinadas situaciones patológicas, especialmente enfermedades cardiovasculares, está demostrada. El control de su ingesta es básico en una dieta saludable. En este aspecto, la industria alimentaria tiene un papel fundamental, para sustituir estos productos por otros no nocivos, así como reflejar en el etiquetado su procedencia exacta, sin ambigüedades.

Finalmente, aunque no en último lugar, se incluye un informe sobre la enfermedad celíaca y los métodos de determinación de gluten en los alimentos. La enteropatía sensible al gluten o enfermedad celíaca es uno de los paradigmas de las reacciones adversas a alimentos por hipersensibilidad dependientes del propio individuo y no del alimento. Ante la necesidad de una dieta sin gluten, es necesario disponer de métodos fiables que garanticen qué alimentos pueden consumir sin riesgo los celíacos. Actualmente, se dispone de métodos suficientemente sensibles en relación con la reglamentación actual de niveles máximos permitidos de gluten. Sin embargo, aún quedan muchas lagunas en el conocimiento de la celíaca, como cuál puede ser realmente la cantidad de gluten tolerable o el conocimiento exacto de la fracción o fracciones proteicas responsables, que habrán de tenerse en cuenta para la búsqueda de nuevos métodos o adaptación de los existentes.

De la consideración global de los informes incluidos en este número de la Revista del Comité Científico se deduce fácilmente la importancia de la valoración objetiva del posible riesgo de estas situaciones tan diversas. Para ello, es fundamental la intervención de los organismos encargados de la seguridad alimentaria, revisando e interpretando los conocimientos científicos del momento y recomendando normas de actuación que ayuden al legislador a concretar y actualizar las medidas de prevención necesarias.

Manuel Martín Esteban
Miembro del Comité Científico de la AESAN

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre los criterios microbiológicos para las especies patógenas del género *Vibrio* aplicables, como medidas adicionales de control en los puntos de inspección fronterizos, a productos pesqueros importados

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferrí, M^a Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-001

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 17 de febrero de 2010

Grupo de Trabajo

Elias F. Rodríguez Ferrí (Coordinador)

Albert Bosch Navarro, Alberto Cepeda Sáez

Lucas Domínguez Rodríguez, Andrés Otero Carballeira

Gonzalo Zurera Cosano

Elena Carrasco Jiménez (C. Externa)

Fernando Pérez Rodríguez (C. Externo)

Antonio Valero Díaz (C. Externo)

Resumen

El presente informe pretende determinar la vigencia del actual sistema de control sanitario de productos de la pesca congelados en puestos de inspección fronterizos, en relación a las especies patógenas del género *Vibrio* y muy especialmente, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* y *V. vulnificus*.

En vista de los conocimientos científicos actuales y de la evaluación del riesgo, parece justificada la aplicación de criterios microbiológicos en los puntos de inspección fronterizos como medida adicional y complementaria de control. En lo que se refiere específicamente a *V. cholerae* se recomienda aplicar un criterio de tolerancia cero sin distinción entre serotipos. En el caso de serotipos distintos de O:1 y O:139 se recomienda identificar los productos de mayor riesgo para el consumidor y adoptar medidas de vigilancia efectivas.

Respecto de *V. parahemolyticus*, se considera adecuada la aplicación de un límite máximo de 10^2 ufc/g y que el criterio microbiológico y plan de muestreo establecido en los puntos de inspección fronterizos para esta especie es adecuado y suficiente. En capturas procedentes de zonas de riesgo, debería establecerse un plan de vigilancia especial como paso previo para la adopción de otro tipo de criterios.

Se recomienda extender, igualmente, la vigilancia de pescado y mariscos procedentes de zonas de riesgo a *V. vulnificus*. Igualmente se recomienda mantener cierta cautela respecto de las mismas zonas (de riesgo) en lo que se refiere a cualquiera otra especie de *Vibrio*, en particular las consideradas.

Además cabe destacar, que la temperatura de mantenimiento del pescado y productos de la pesca tiene una importancia crítica en el control de potenciales brotes por estos microorganismos.

En España, en función de los datos disponibles, el riesgo de padecer enfermedad por el consumo de productos pesqueros contaminados, puede calificarse con carácter general de muy bajo.

Palabras clave

Puntos de Inspección Fronterizos, productos de la pesca, *Vibrio*, criterios microbiológicos.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the applicable microbiological criteria for pathogenic species of the genus *Vibrio* in imported fishery products, as additional control measures at border inspection posts.

Abstract

The present report aims to determine the currency of the present system for health-related control of frozen fishery products at border inspection posts, with regard to the pathogenic species of the genus *Vibrio* and more specifically, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*.

In view of the current scientific knowledge and risk assessment, the application of microbiological criteria at border inspection posts is justified as an additional and complementary control measure. With regard to *V. cholerae* specifically, it is recommended to apply a zero-tolerance criterion without distinguishing between serotypes. In case of serotypes other than O:1 and O:139, it is recommended to identify the products with the greatest risk for consumers and to adopt effective surveillance measures.

With respect to *V. parahaemolyticus*, the application of a maximum limit of 10² cfu/g is considered adequate and the microbiological criterion and sampling plan established at border inspection posts for this species are adequate and sufficient. In catches from areas at risk, a special surveillance plan should be established as a preliminary step for the adoption of another kind of criterion.

Similarly, it is recommended to extend the surveillance over fish and shellfish from areas at risk to *V. vulnificus*. In addition, it is recommended to keep certain caution with respect to the same areas (at risk) for any other species of *Vibrio*, particularly those considered here.

Furthermore, it should be highlighted that the temperature at which fish and fish products are maintained is of critical importance in the control of potential outbreaks due to these micro-organisms.

In Spain, in light of available data, the risk of suffering illness due to the ingestion of contaminated fishery products can be generally classified as very low.

Key words

Border Inspection Posts, fishery products, *Vibrio*, microbiological criteria.

Introducción

La Dirección Ejecutiva de la AESAN ha trasladado al Comité Científico una consulta sobre “la vigencia del actual sistema de control sanitario de productos de la pesca congelados en puestos de inspección fronterizos” en lo que se refiere a las siguientes cuestiones:

1. Respecto de la detección de *Vibrio parahaemolyticus*, actualmente basada en la aceptación de su presencia hasta concentraciones de 100 ufc/g. En caso contrario, posibles criterios microbiológicos a seguir en relación con la presencia del citado microorganismo en productos de la pesca procedentes de países terceros.
2. Respecto de *Vibrio cholerae*, del que actualmente solo se adoptan medidas adicionales de control en frontera ante la detección de los serotipos O1 y O139, se consulta sobre la conveniencia de la medida o, en caso contrario, sobre posibles criterios microbiológicos en relación con su presencia en productos de la pesca procedentes de países terceros.
3. Respecto de criterios microbiológicos aplicables a productos importados, referidos a especies patógenas del género *Vibrio*.
4. Respecto de si los criterios microbiológicos aplicables actualmente son consistentes con las evaluaciones de riesgo e información científica actual y, en su caso, los criterios que debieran aplicarse si sus instrucciones son incorrectas o insuficientes.

En el desarrollo de este informe se sigue la metodología clásica de Evaluación del Riesgo Microbiológico (Comisión del *Codex Alimentarius*, 1999).

Identificación del peligro

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae* de la clase Vibrionales. Recientemente se han separado de la familia los géneros *Aeromonas* y *Plesiomonas*, que en la actualidad se integran en otras familias. Incluye bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, fermentadores de carbohidratos, oxidasa y catalasa positivos, móviles por flagelos polares, por lo general, sensibles al agente vibriostático O/129 y que para su crecimiento requieren NaCl (son halófilos). Son ubicuos, ampliamente difundidos en la naturaleza en ambientes acuosos dulces o salinos, en zonas de litoral y estuarios, cuya especie tipo, *V. cholerae*, es un importante patógeno humano.

En la actualidad se reconocen en el género *Vibrio* un total de 48 especies diferentes¹ de las que 11 se consideran patógenos humanos de mayor o menor importancia. Destacan por su interés y gravedad *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Austin y Austin, 2007) que o bien se han implicado en brotes de enfermedad humana o poseen potencial para ello (Austin, 2009). *V. anguillarum* y *V. tapetis* se asocian con enfermedades de peces. En el grupo de microorganismos de bajo riesgo (Austin, 2009) se incluyen *V. hollisae*, que ocasionalmente se ha asociado con gastroenteritis relacionada con el consumo de marisco crudo; *V. alginoliticus*, que produce infecciones de heridas y oídos; *V. fluvialis*, relacionado en la India con casos de gastroenteritis e infecciones de heridas, al igual que *V. harveyi*. Y otros (*Photobacterium damsela*, *V. furnisii*, *V. metschnikovii* y *V. mimicus*), aunque de forma menos precisa en lo que se refiere a la relación con enfermedad.

¹ICSP Subcommittee on the Taxonomy of *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae* and related organisms - April 2003.
<http://www.the-icsp.org/taxa/vibriolist.htm#vibrio>

Los brotes y episodios de enfermedad en humanos, aunque poco frecuentes, implican típicamente infecciones por heridas y enfermedad gastrointestinal, a menudo con diarrea acuosa. Su origen no puede asociarse de forma definitiva con animales, pudiendo ser las aguas en las que se encuentran los peces. La transmisión al hombre se produce a través de heridas o del consumo de alimentos/agua. Hasta la fecha no se ha descrito correlación entre los niveles de *Vibrio* y la de patógenos o indicadores de contaminación fecal humanos.

V. cholerae es el agente del cólera humano. Originalmente fue aislado por R. Koch en 1884 a partir de enfermos de cólera, en Egipto, y ha sido responsable de epidemias y pandemias en todas las épocas, especialmente en Grecia, China y la India. En 1817 se produjo la primera pandemia de cólera fuera de Asia y desde entonces se han producido siete pandemias nuevas. La última se inició en Indonesia en 1961 y desde allí se propagó a África (1970) y América Latina (1991), extendiéndose después a los Estados Unidos. Está producida por *V. cholerae* El Tor, que después de más de 40 años se mantiene, aunque presenta patrones epidemiológicos diferentes dependiendo de la región a la que afecta (endemicidad en regiones en desarrollo y brotes esporádicos en otros lugares). Actualmente es endémico en varias regiones del sudeste asiático. En España solo se describen casos importados aunque en los años 70 se produjeron tres epidemias con una incidencia entre 200 y 300 casos.

En la actualidad, se reconocen alrededor de 200 serogrupos de *V. cholerae* sobre la base de la composición del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) y sólo dos, los serogrupos O:1 y O:139 se consideran responsables de epidemias de cólera, siendo los únicos capaces de producir toxina colérica (TC). Dentro del serogrupo O:1, se incluyen dos biotipos: clásico y El Tor y, en cada uno de ellos, se integran tres serotipos diferentes: Inawa, Ogawa e Hikokima. El resto de serogrupos se reconocen como no O:1/no O:139, pudiendo aislarse de fuentes ambientales produciendo esporádicamente casos de gastroenteritis e infecciones extraintestinales. Se ha descrito que ocasionalmente algunas cepas no O:1/no O:139 pueden producir toxina colérica, pero no producen episodios o brotes epidémicos (Kaper et al., 1995).

Las cepas del serogrupo O:139, surgido en la India y Bangladesh en 1992 están muy relacionadas con las del serogrupo O:1 El Tor, responsable de la última pandemia, aunque difieren en la presencia de cápsula, la composición del LPS (contiene colitosa) y carecen de varios genes *rfb* responsables de la síntesis y ensamblaje del antígeno O, lo que parece indicar que su origen es el propio serogrupo O:1 por adquisición de DNA procedente del exterior (Popovic et al., 1995).

V. cholerae presenta un ciclo de vida libre formando parte de ecosistemas acuáticos en los que frecuentemente se asocia como comensal a peces, moluscos o crustáceos. Puede asociarse a la quitina de los caparazones de algunos crustáceos y adherirse a la superficie de algas, fitoplancton, copépodos y raíces de plantas acuáticas (Faruque et al., 1998), aunque de estos ambientes se aíslan principalmente cepas no O:1/no O:139. En cualquier caso, la adquisición de factores de virulencia les capacita para colonizar la mucosa intestinal y si adquieren la capacidad de producir toxina, producen enfermedad (Kaper et al., 1995).

Son factores de virulencia los flagelos y pili, que permiten a la bacteria desplazarse en la mucosa intestinal y adherirse al epitelio. La toxina colérica es una toxina tipo A-B, formada por una unidad A y cinco B que le sirven de soporte. Un vez que estas últimas se unen a los receptores GM1 de la superficie celular se produce un cambio conformacional en la molécula que permite la separación y entrada de la subunidad A al interior celular. En el interior, la subunidad A se disocia en dos fragmentos A₁ y A₂ y

el primero produce la hidrólisis del NAD liberando ADP-ribosa que se fija covalentemente e inactiva la proteína G y, como consecuencia, activa la adenilato ciclasa. El resultado es el incremento del AMP cíclico intracelular, que da lugar a la liberación de electrolitos y comienzo de la diarrea típica, acuosa, 'en agua de arroz'.

El hombre es el único hospedador de *V. cholerae* aunque se ha señalado la existencia de reservorios ambientales, no identificados, en los que el microorganismo permanecería en estado latente, no cultivable. Fenómenos naturales relacionados con el calentamiento oceánico, como El Niño, pueden asociarse a la aparición de brotes de cólera que se relacionan con el aumento de la temperatura del agua, de la concentración de nutrientes y de la población de fitoplancton (Colwel, 1996). Aunque no se considere un patógeno zoonótico, en los últimos años se han descrito brotes epizooticos de enfermedad en poblaciones de peces de los que se han aislado cepas de *V. cholerae*. Se incluyen especies de ayu (o pez dulce, *Plecoglossus altivelis*) en Japón, en carpa dorada en Australia e incluso a partir de tiburones (Austin y Austin, 2007). También existen descripciones de que cepas no O:1/no O:139 pueden asociarse con enfermedad en camarones (Haldari et al., 2007) y en peces ornamentales (Swaminathan et al., 2007) en la India.

Recientemente se han secuenciado los dos cromosomas circulares de *V. cholerae*, siendo éste uno de los primeros microorganismos en los que se ha completado la secuenciación de su genoma. En las cepas patógenas, además de los genes que codifican para la TC están también presentes genes que codifican para un factor de colonización denominado TCP (*toxin co-regulated pilus*) y la proteína reguladora ToxR que co-regula la expresión de ambos (Herrington et al., 1988). Ambos genes se transfieren horizontalmente mediante infección fágica (el operón *ctxAB*, de la TC, forma parte del genoma del fago CTXÆ que esta lisogenizado en *V. cholerae*) y se ubican en elementos genéticos repartidos en el cromosoma I (el mayor) de la bacteria. Las cepas toxigénicas ordinariamente llevan una o varias copias del operón *ctxAB*. TCP actúa como receptor del fago y promueve la colonización del epitelio intestinal por la bacteria; sus genes se localizan dentro de una isla de patogenicidad de 40 kb que también es transferida por otro fago filamentoso (VPIÆ). Resulta muy interesante el hecho de que ambos fagos (CTXÆ y VPIÆ) podrían participar en la emergencia de nuevos clones epidémicos de *V. cholerae* a partir de acontecimientos que tendrían lugar en el medio acuático (síntesis de partículas del fago VPIÆ a partir de cepas toxigénicas) y en el intestino humano (transformación de cepas apatógenas en patógenas) cuya distribución a partir de las heces de enfermos y portadores incluiría la contaminación de ambientes acuáticos (Faruque et al., 1998). A este respecto, estudios recientes han descrito la presencia de genes de virulencia (*ctxAB* y *zot*) en cepas de *V. cholerae* de origen ambiental en la India y Brasil. La misma observación se ha descrito también en aguas de la Bahía de Newport, en California (Jiang et al., 2003) aunque por el momento no se han señalado evidencias de toxicidad asociada.

Además de la TC, también se ha descrito la producción de otras toxinas entre las que destaca una toxina RTX (del inglés, *repeat in toxin*), capaz de romper los filamentos de actina, aunque se desconoce su papel en la patogénesis de la enfermedad. Un importante número de enzimas producidas por *V. cholerae* actúan a nivel intestinal facilitando el proceso de adherencia y colonización, incluyendo neuraminidasas, mucinasas y proteasas. También se ha descrito una proteasa con propiedades de

hemaglutinina sensible a la manosa que participa en la formación de biofilms en ambientes acuáticos, que facilitan la supervivencia (Watnick et al., 1999).

V. cholerae está presente en el agua marina contaminada a partir de desembocaduras de ríos a su vez contaminados con aguas fecales, pudiendo sobrevivir en el agua durante largos periodos de tiempo, como se hizo patente en las costas del Golfo de México y en Australia, donde se ha venido aislando el mismo serotipo de *V. cholerae* O1 a lo largo de más de 20 años (Blake et al., 1983). En un estudio realizado entre 1997 y 1998, en el que se analizaron 420 muestras de agua, en 44 (8,09% del total) se describió la presencia de *V. cholerae* no-O1, y se consideró que sus enterotoxinas podrían constituir un riesgo potencial de gastroenteritis en humanos (Manfrin et al., 2001). Sin embargo, el cólera se ha caracterizado por ser una enfermedad de carácter estacional, debido a que la transmisión de *V. cholerae* está influenciada por una serie de factores ambientales como la temperatura, condiciones de salinidad del agua, nutrientes, o por los diferentes métodos de captura y formas de consumo de los productos pesqueros.

La prevalencia de *V. cholerae* en productos derivados de la pesca se considera baja en general; de hecho, no se han encontrado O1 ni O139 en gambas (Gopal et al., 2005), ni en muestras de agua y sedimentos. Dalsgaard et al. (1995) citaron una prevalencia de un 2% de muestras con O1 en productos del sudeste asiático, pero después se demostró que el serotipo aislado carecía del gen de la TC. En otros estudios los niveles de prevalencia de otros serotipos no-O1/no-O139 se encuentran alrededor del 5% (Ottaviani et al., 2009), siendo predominantes los serogrupos O26 y O51. Sin embargo, no se ha demostrado con claridad si estos serotipos son capaces de producir enfermedad en humanos. Algunos brotes epidémicos por *V. cholerae* se han asociado al consumo de marisco contaminado, incluyendo ostras crudas (Morris, 2003) y cangrejos (CDC, 1991) e implicando cepas no-O1 y no-O139 (Farama et al., 2008).

A nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los casos de cólera en 2008 aumentaron respecto a 2007, con un total de 190.130 casos y 5.143 muertes, que representa un incremento del 7,6% y del 27% en el número de casos y muertes, respectivamente.

V. parahaemolyticus está ampliamente distribuido en ambientes marinos. Se puede aislar de una gran variedad de productos de la pesca crudos, particularmente de marisco (especialmente ostras), cuyo consumo produce el contagio humano (De Paola et al., 2003) (Drake et al., 2007).

V. parahaemolyticus produce distintos factores de virulencia entre los que se incluyen dos hemolisinas, una termoestable (TDH –*thermostable direct haemolysin*–) con carácter de b-hemolisina (fenómeno de Kanagawa en agar sangre de Wagatsuma) y otra relacionada (TRH) codificada por el gen *trh*, cuya presencia conjunta o independiente se asocia con aislados de origen clínico y producción de ureasa y no se asocia con los de origen ambiental. La TDH se asocia efectos enterotóxicos, cardiotóxicos y citotóxicos, aunque el mecanismo de producción no se conoce. También se ha descrito una hemolisina termolábil (TLH), codificada por el gen *tlh*, que se ha descrito en más del 90% de las cepas de origen clínico y, lo contrario, en menos del 1% de las cepas de origen ambiental. También se ha descrito enteroinvasividad en el modelo conejo en el que la bacteria invade, coloniza y produce inflamación en el intestino delgado (Chatterjee et al., 1984).

La incidencia de la enfermedad en Asia, Europa y Estados Unidos diverge significativamente; a modo de ejemplo, en Osaka (Japón), *V. parahaemolyticus* fue reconocido como la causa de un brote con

272 casos de enfermedad y 20 muertes, asociado al consumo de sardinas (Daniels et al., 2000a). Posteriormente se ha implicado en el 20-30% de los casos de origen alimentario en dicho país (Alam et al., 2009) e identificado como una causa común de enfermedad en otros muchos países asiáticos (Wong et al., 2000) (Deepanjali et al., 2005), como sucede en Taiwán, que entre 1981-1999, los casos de gastroenteritis por *V. parahaemolyticus* representaron el 69% del total de brotes de origen alimentario (Anónimo, 2005) y en China el 31,1% (Liu et al., 2004). Por el contrario, en Europa raramente se han producido infecciones por esta causa, aunque se han documentado brotes esporádicos en España y Francia. En la Tabla 1 se representan los brotes más importantes acontecidos en Europa por *V. parahaemolyticus*. Con independencia de los brotes referenciados en la misma, el BEP (Boletín Epidemiológico Semanal, del Centro Nacional de Epidemiología-Instituto de Salud Carlos III) recoge un histórico de 35 brotes entre 1994 y 2003, con un máximo de seis brotes en los años 1996 y 1997 y un mínimo de uno en 1994. En el citado informe se señala que los cuatro brotes correspondientes a 2003, sumaron un total de 98 casos, todos ellos producidos por el consumo de pescado y mariscos contaminados. El último informe de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, actualizado al 1 de noviembre de 2009 y correspondiente a la semanas 1 a 13 de ese año, incluye un caso de enfermedad de transmisión alimentaria en la que se implicó *V. parahaemolyticus*, en Cataluña.

País	Año	Nº casos	Alimento implicado	Referencia
España	1989	8	Pescado y marisco	Molero et al., 1989
España	1999	64	Ostras crudas	Lozano-León et al., 2003
Francia	1997	44	Langostinos importados de Asia	Robert-Pillot et al., 2004
España	2004	80	Cangrejo cocido en condiciones de higiene deficientes	Martínez-Urtaza et al., 2005

Al igual que en el caso de Europa, en Estados Unidos los brotes producidos por *V. parahaemolyticus* son esporádicos. En 1971 cuando se identificó *V. parahaemolyticus* por primera vez como un agente etiológico, tras la aparición de tres brotes con 425 casos de gastroenteritis asociados con el consumo de cangrejo inadecuadamente cocinado en Maryland (Molenda et al., 1972). Entre 1973-1998 los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) han descrito un total de 40 brotes (Daniels et al., 2000a). De entre ellos, cuatro brotes entre 1997 y 1998, que incluyeron mayor número de casos (por encima de 700) se asociaron al consumo de ostras crudas (CDC, 1998) (DePaola et al., 2000). Más recientemente, tuvo lugar un brote por consumo de ostras contaminadas procedentes de Washington y la Columbia Británica, que se saldó con un total de 177 casos (CDC, 2006).

Desde el punto de vista epidemiológico resulta de interés la creciente atención del serotipo O3:K6 que desde 1996 ha incrementado su presencia en Asia. Primero se describió en la India (Calcuta) y en corto espacio de tiempo hizo su aparición en Taiwán, Laos, Japón, Tailandia y Corea, desde donde se extendió a otros países (Chile, Rusia y los Estados Unidos) y más recientemente hizo su aparición en África y la costa francesa. En definitiva, el serotipo O3:K6 está difundido en la actualidad por cuatro

continentes (Okuda et al., 1997) (DC, 1999) (Daniels et al., 2000b) (Chiou et al., 2000) (Vuddhakul et al., 2000) (González-Escalona et al., 2005) (Martínez-Urtaza et al., 2005) y los estudios moleculares han puesto de manifiesto que las cepas de este serotipo asociadas con brotes epidémicos conforman un grupo genético definido, distinto de otras cepas no epidémicas y, también, de las cepas O3:K6 aisladas antes de 1996. Otros serotipos, como el O4:K68 y O1:KUT (no tipificable) parece que se han originado a partir del clon pandémico y se han señalado como derivados clonales. La variación ha continuado y desde 1998 se han descrito un total de 20 serovariantes con la misma consideración. O4:K68, O1:K125 y O1:KUT poseen secuencias *toxRS*, perfiles AP-PCR, ribotipos y perfiles PFGE idénticos a los del O3:K6. El O6:K18 comparte identidad molecular con el O3:K6. El resto, descritos por una gran variedad de técnicas de caracterización molecular, aislados en el curso de brotes diarreicos en diversas partes del mundo se consideran, como hemos señalado, derivados clonales, originados por alteración o modificación de los antígenos O:K. La lista, además de los descritos antes, incluye también: O4:K12, O1:K41, O1:K56, O3:K75, O4:K8, 5:KUT, O4:KUT, O5:KUT, O5:K17, O5:K25, O1:K33, O2:K3, OUT:KUT, O3:KUT, O3:K5, O4:K4, O4:K10 y O6:K18.

En el brote más importante de la enfermedad descrita en España, en Galicia en 1999, al que ya hemos hecho referencia, se aislaron varios serotipos, incluyendo O4:K11, O4:KUT y mediante PFGE pudo comprobarse que se trataba de un cluster claramente diferenciado de otros aislados originarios de Asia o América (Martínez-Urtaza et al., 2004).

Respecto de la relación de posibles factores de virulencia con el potencial pandémico, por el momento es una situación no resuelta y la mayor parte de los factores y su génesis se desconocen; se ha especulado con la posibilidad de que el fago f237 (ORF8), a semejanza de lo que ocurre con *V. cholerae*, fuera responsable de mayores niveles de adherencia y citotoxicidad, pero no ha podido recuperarse de aislados de casos clínicos de O3:K6. Ha llegado a afirmarse que el 28% de las combinaciones O:K reconocidas de *V. parahaemolyticus*, ha adquirido potencial pandémico (Balakrish Nair y Hormázabal, 2005). Debe precisarse, en cualquier caso, que la utilización del término pandémico aplicado al O3:K6 y el resto de serovariantes alude más a la descripción hecha por los investigadores que a una situación real de pandemia. Recientemente se ha descrito, en un estudio llevado a cabo a partir de cepas aisladas en Galicia (Martínez-Urtaza et al., 2008) la existencia de una relación entre la presencia del agente y su número y variables ambientales, incluyendo salinidad (mayor presencia en otoño, coincidiendo con una baja salinidad) con densidades medias de 1.234 NMP/100 g.

Se ha demostrado que muchas de las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas del medio ambiente y productos pesqueros no son patógenas (Nichibuchi y Kaper, 1995) (FDA, 2005) y, a pesar de la relación descrita entre cepas productoras de TDH y aislamiento clínico (ver antes), también se han aislado de pacientes cepas KP negativas, por tanto no productoras de TDH, pero productoras de TRH (Honda et al., 1987) (Honda et al., 1988) (Shirai et al., 1990).

En estas condiciones, en el medio ambiente, la detección de *V. parahaemolyticus* virulento representa un problema a la hora de diferenciarlo de las cepas avirulentas. El recuento total, indiferenciado, se utiliza habitualmente como control de contaminación de alimentos. En relación con las consideraciones anteriores, claramente debería considerarse un indicador inadecuado (Balakrish Nair y Hormázabal, 2005) y la prueba está en brotes epidémicos que tuvieron lugar en los Estados Unidos pese a que los

recuentos del NMP fueron inferiores a 10^4 ufc/g (Pat et al., cit por Balakrish Nair y Hormázabal, 2005).

Vibrio vulnificus es considerado un oportunista virulento y letal para determinados grupos de riesgo humanos, con una tasa de mortalidad que puede superar el 50% (Jones y Oliver, 2009) llegando incluso al 90% en casos de hipotensión grave. Desde un punto de vista general puede definirse como un microorganismo complejo con caracteres fisiológicos que contribuyen a su supervivencia en los ambientes marinos y en el hospedador humano.

Sobre la base de sus características bioquímicas, *V. vulnificus* es un Gram negativo halofílico, fermentador de la lactosa, que se clasifica en biotipos 1-3 (producción de indol y fermentación de la celobios). Las cepas pertenecientes al biotipo 1 son responsables de la mayoría de las infecciones humanas, mientras que las del biotipo 2 generalmente se asocian a procesos clínicos en las anguilas aunque se han descrito varios casos de infecciones de heridas en el hombre. El biotipo 3 (Bisharat et al., 1999) es en la práctica un híbrido de los dos biotipos anteriores (1 y 2) y es causa de infecciones de heridas en el hombre.

El biotipo 2 es heterogéneo y puede subdividirse en diferentes serovares. La primera descrita fue la serovar E (equivalente al serovar O4 del sistema de clasificación de Martin y Siebelin, 1991) que parece ser genéticamente homogénea, independientemente de su origen (peces o humano), porque constituye una excepción en el sentido de que se han descrito casos humanos producidos por él. El serovar A apareció en el año 2000 en anguilas, en España. Los serovares O3 y O3/4 solamente se han aislado en una ocasión a partir de anguilas, en Dinamarca (Fouz et al., 2007).

El microorganismo tiene su hábitat natural en los ambientes marinos costeros de todo el mundo y hasta la fecha ha sido aislado de agua, sedimentos y una amplia variedad de pescados y mariscos incluyendo peces, camarones, ostras, almejas, etc. (Baffone et al., 2006) (Mahmud et al., 2008).

V. vulnificus posee un variado arsenal de factores de virulencia incluyendo la capacidad de neutralización ácida, cápsula polisacárida, sistemas de captación de hierro, citotoxicidad, movilidad y adhesinas de carácter protéico, todos los cuales requieren un sistema de regulación en el proceso patogénico. Estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de linajes genéticos. En el biotipo 1, que es el causante principal de las infecciones humanas, se ha descrito una isla de patogenicidad de 33 kb que incluye varios genes que parece se relacionan con la patogenicidad en otros patógenos, por lo que se ha sugerido que las cepas que la poseen son potencialmente virulentas.

La descripción de casos de infección por *V. vulnificus* ha aumentado sustancialmente en los últimos años, desconociéndose las causas responsables de este hecho. En Israel se han descrito varios brotes que se han relacionado con el aumento de las temperaturas, lo que hace pensar que el cambio climático podría relacionarse con un incremento de este tipo de enfermedades y su distribución en todo el mundo, pese a que la tasa de infección sigue relativamente baja, circunstancia que contrasta con el carácter ubicuo del microorganismo en los ambientes marinos. La explicación, al menos en parte, tiene que ver con que *V. vulnificus* raramente causa enfermedad grave en individuos sanos, mientras que en pacientes con problemas de salud, como enfermedades crónicas del hígado, diabetes, hemacromatosis, SIDA, tumores malignos y situaciones de inmunosupresión, el riesgo es elevado; de hecho, los individuos con el sistema inmune alterado o con enfermedades hepáticas, están 80 veces más predispuestos a padecer situaciones de septicemia que los individuos sanos (Klontz et al., 1988).

Caracterización del peligro

1. *V. cholerae*

Es el causante de las pandemias humanas de cólera, un tipo de gastroenteritis causada por cepas productoras de la toxina del cólera que cursa con diarrea acuosa muy abundante (en "agua de arroz") que puede conducir a la muerte (Morris, 2003).

Después de un periodo de incubación que oscila desde unas pocas horas hasta cinco días, comienza de forma brusca una intensa diarrea acuosa, indolora y, ocasionalmente, con vómitos. La diarrea se describe típicamente "en agua de arroz" como consecuencia de la presencia de mucosidad, pero sin sangre. En algunos casos la deshidratación es extrema y, sin tratamiento, puede ser fatal.

V. cholerae se transmite a través de la ingestión de alimentos y agua contaminados con restos fecales o material del vómito de enfermos o portadores. La barrera gástrica es muy eficiente en controlar la infección hasta el punto de que dosis de 10^{11} ufc a voluntarios humanos rara vez producen síntomas, mientras que la neutralización del pH, simplemente con NaHCO_3 , produce la enfermedad con tan solo 10^4 ufc.

Una vez superado el estómago, los microorganismos colonizan el epitelio mucoso del intestino delgado y secretan la TC (los serogrupos coleregénicos) que en último extremo es la principal responsable del cuadro clínico.

La tasa de mortalidad puede alcanzar el 30-50% en individuos susceptibles, si la enfermedad no se diagnostica a tiempo (Bennish, 1994). Sin embargo, el tratamiento de la enfermedad está bastante desarrollado y, en la mayoría de los casos, esta tasa se reduce hasta el 1%. De hecho, la OMS indica que aproximadamente un 90% de los casos de cólera presentan una sintomatología leve o moderada, siendo difíciles de diferenciar clínicamente de otros casos de diarrea profusa.

Históricamente, el cólera se ha asociado a cepas toxigénicas del serogrupo O1, aunque como se ha señalado antes, algunas descripciones señalan la capacidad de producir toxina por parte de cepas no O:1/no O:139 si bien en ningún caso se han relacionado con situaciones de interés epidemiológico. Por tanto, la cuestión fundamental es si las cepas de *V. cholerae* en animales acuáticos portan o no el gen de la toxina y en relación con ello, efectivamente, algunos aislados ambientales se han asociado a la toxigenicidad, como ha sucedido por ejemplo, a partir de aguas marinas de la costa oeste de Estados Unidos, de donde se han recuperado cepas que portan el gen de la toxina (*ctxA* y *zot*) (Jiang et al., 2003). También recientemente se ha descrito la presencia de genes de virulencia relacionados con la producción de TC en cepas de origen ambiental en diversos estudios llevados a cabo en la India, Brasil y Estados Unidos (California), aunque hasta la fecha no se haya descrito toxicidad en las mismas.

En cualquier caso, se ha demostrado que la capacidad de producir toxina, igual que la de producir otros factores de virulencia, puede adquirirse de forma horizontal por parte de cepas ambientales de *V. cholerae* no O:1, no O:139, por mediación de fagos, lo que puede dar lugar a la emergencia de clones epidémicos. Además, en los últimos años se han descrito brotes epizooticos de los que se ha aislado *V. cholerae*, de diversas especies de peces y de algún tipo de marisco, lo que podría incluir la posible consideración de zoonosis por parte de algunas variantes del agente, generalmente de procedencia ambiental.

Según se ha señalado anteriormente, *V. cholerae* es muy sensible al pH ácido, por lo que en caso de ingestión normalmente se inactiva rápidamente en el estómago (Levine et al., 1984), circunstancia

que hace que la frecuencia de enfermedad, en la práctica, sea baja. Glass y Black (1992) estimaron una dosis infectiva del orden de 10^2 - 10^3 ufc aunque en diversos estudios realizados en humanos dicha dosis resultó mucho más alta. En este sentido, se han llevado a cabo estudios en los que dosis de hasta 10^{11} ufc en individuos no susceptibles no causaron enfermedad, mientras que dosis entre 10^4 y 10^8 ufc suministradas con 2 g de bicarbonato sódico (que neutraliza el pH gástrico) si provocaron enfermedad en los mismos individuos. En otros estudios con dosis más bajas (10^3 - 10^5 ufc) la probabilidad de contraer enfermedad osciló en torno al 60%, aunque con dosis inferiores a 10^4 ufc los síntomas fueron más leves y los periodos de incubación más prolongados (Levine et al., 1981).

2. *V. parahaemolyticus*

La infección en humanos por *V. parahaemolyticus* desencadena gastroenteritis aguda con diarrea, acompañada generalmente con dolor de cabeza, vómitos, náuseas y calambres abdominales (Cho et al., 2008).

El periodo de incubación oscila entre 4 y 96 horas, con una media de 15 horas. El cuadro clínico se considera autolimitante, de gravedad moderada, y un promedio de duración de tres días en pacientes sanos. Incluye diarrea, dolor abdominal, náuseas, vómitos, dolor de cabeza y fiebre baja; en ocasiones la diarrea es sanguinolenta, "como carne lavada", denominación con la que se describe un tipo de heces de color rojizo acuoso, pero diferente del que se puede ver en otros cuadros diarreicos parecidos, como en los producidos por *Shigella* o amebas. Además del cuadro gastroentérico, *V. parahaemolyticus* puede ser causa de infección de heridas y septicemia.

En Dinamarca, en el periodo 1987-1992, se aisló el microorganismo de 13 pacientes, de los cuales tres y diez presentaron heridas e infecciones de oído, respectivamente y todos ellos se asociaron con el ambiente marino (Hornstrup y Gahrhansen, 1993). En los últimos años *V. parahaemolyticus* se ha transformado en la causa principal de gastroenteritis asociada al consumo de productos pesqueros en Estados Unidos y, a nivel internacional, es un importante patógeno de origen marino (Kaysner y DePaola, 2001). Aunque normalmente la gastroenteritis producida por este agente es autolimitante, en pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades crónicas puede causar septicemia de pronóstico grave o muy grave.

V. parahaemolyticus se considera un patógeno de interés creciente cuya vigilancia sanitaria previa al consumo se limita a que su número no exceda 100 ufc/g de pescado procedente de zonas de riesgo. Según se ha descrito en la parte expositiva de este informe, además de considerar su incremento general en todo el mundo, en algunas regiones se considera la toxiinfección alimentaria más frecuente asociada al consumo de pescado y, de forma particular, en Asia, donde es causa de la mitad de los brotes de este tipo y todos los serotipos tienen la consideración de capacidad pandémica (epidémica) potencial. Incluso en España, en Galicia y otras zonas costeras, se ha sufrido la experiencia de varios brotes importantes de la enfermedad, con hospitalizaciones incluidas.

Merece especial atención cuanto se refiere al serotipo epidemiológico O3:K6 que desde 1996 es la causa principal de enfermedad humana por consumo de pescado o marisco contaminado. Hasta la fecha se ha puesto de manifiesto una gran evolución de este serotipo del que se han descrito más de 20 serovariantes que se consideran derivados clonales surgidos por modificación o alteración

de la estructura antigénica, pero manteniendo su potencial patógeno intacto. Algunos autores han llegado a afirmar que casi un tercio de las combinaciones O:K de *V. parahaemolyticus* ha adquirido potencial pandémico (epidémico). Igualmente se ha señalado que el recuento total, indiferenciado de *V. parahaemolyticus*, como control de la contaminación alimentaria no es un buen indicador de la situación de riesgo alimentario.

La dosis de riesgo se ha estimado en voluntarios humanos, con un rápido desarrollo de gastroenteritis después de la ingestión de niveles de 2×10^5 a 2×10^7 ufc del patógeno KP positivo; por otra parte, voluntarios que recibieron hasta $1,6 \times 10^{10}$ ufc de un aislado KP negativo, no exhibieron signos de diarrea (Sanyal y Sen, 1974) (Oliver y Kaper, 1997). Sin embargo, en los brotes acontecidos en Canadá y Estados Unidos durante 1997 y 1998 por consumo de ostras, el análisis de muestras evidenció valores inferiores a 200 ufc/g de carne de ostra, lo que sugiere que la enfermedad puede aparecer como consecuencia de la exposición del agente a niveles mucho más bajos de los que habitualmente se habían considerado (CDC, 1999).

Con respecto a los modelos de dosis-respuesta (D-R) de *V. parahaemolyticus*, uno de los escasos modelos disponibles es el desarrollado por la FDA/CFSAN (2000). Basado en este estudio, se ha aplicado un modelo de dosis-respuesta tipo *Beta-Poisson*, con objeto de obtener la probabilidad de enfermar en función de la concentración ingerida del patógeno. El modelo aplicado se describe con la siguiente función:

$$P(\text{enfermedad}) = 1 - \left(1 + \frac{\text{dosis}}{\beta}\right)^{-\alpha}$$

donde α y β son los parámetros a estimar por el modelo, dosis es la cantidad ingerida del microorganismo por servicio o ración expresada en ufc y $P(\text{enfermedad})$ es la probabilidad de que un individuo contraiga enfermedad como consecuencia de la ingestión de una dosis determinada por servicio o ración.

Los parámetros del modelo *Beta-Poisson* utilizados fueron los siguientes: $\alpha=0,6$ y $\beta=1,31 \times 10^6$.

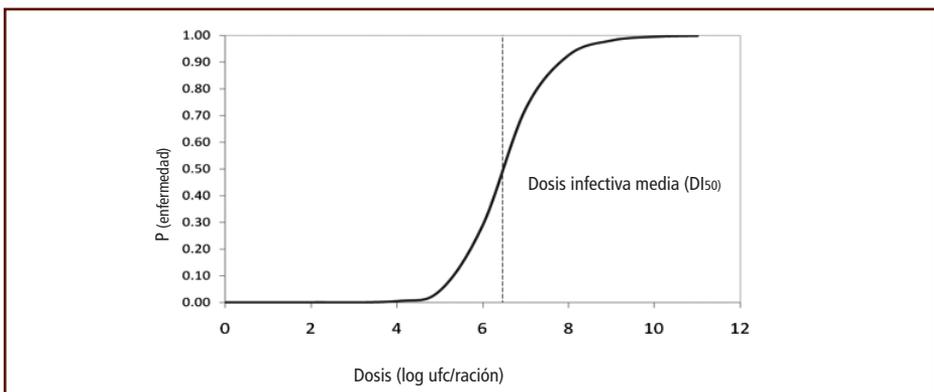


Figura 1. Curva dosis-respuesta para *V. parahaemolyticus* obtenida con el modelo *Beta-Poisson*.

Como se puede observar en la Figura 1, la Dosis Infectiva media (DI_{50}), es decir, la dosis que produciría tras su ingestión una probabilidad del 50% de enfermar, correspondió a un valor de 6,5 log ufc. Este valor se encuentra en concordancia con los datos hasta ahora aportados sobre la posible dosis infectiva.

3. *V. vulnificus*

V. vulnificus se define como un patógeno oportunista de procedencia ambiental e interés muy destacado en los últimos años, especialmente cuando se asocia a determinados grupos de riesgo en los que la infección por consumo o contagio a través de heridas, puede dar lugar a cuadros de una extrema mortalidad, superior al 50% en términos generales e incluso del 90% si se asocian otras características médicas particulares.

El consumo de pescado y marisco crudo contaminado puede dar lugar a una infección sistémica fulminante con fiebre, escalofríos, náuseas, *shock* séptico hipotensor y formación de lesiones secundarias en las extremidades de los enfermos (hasta el 60-70% de los casos) que se desarrollan en un plazo de 36 horas y que se inician en forma de eritema que evoluciona rápidamente a vesículas, ampollas y bullas hemorrágicas que se ulceran. Como se ha señalado, en un porcentaje superior al 50%, especialmente en determinados grupos de riesgo, la enfermedad puede terminar en un desenlace fatal. Especialmente se asocian con este pronóstico la concurrencia con enfermedades crónicas hepáticas, incluyendo cirrosis y hepatitis.

Además de septicemia, *V. vulnificus* se relaciona con infecciones graves de heridas resultantes del contagio de heridas abiertas con aguas contaminadas, como sucede con la práctica de baños en zonas contaminadas por la bacteria, heridas producidas por la manipulación del pescado o mariscos, etc. Igual que sucede en el caso de las infecciones sistémicas, las infecciones de heridas progresan rápidamente a celulitis, equimosis y vesículas que pueden evolucionar más tarde a fascitis necrotizante en el lugar de la infección, aunque en estos casos, la tasa de mortalidad es mucho más baja que en las infecciones sistémicas. Existe la posibilidad de diseminación secundaria al torrente circulatorio. La gastroenteritis es un cuadro menos frecuente que los dos anteriores, pero también se describe; en este caso, el diagnóstico por aislamiento sólo se lleva a cabo por coprocultivo.

En estas condiciones debería incluirse alguna cautela para la inspección en frontera de especies de pescado y marisco procedentes de zonas de riesgo, tanto con carácter general sobre la especie (los tres biotipos pueden ser causa de infecciones de heridas), como en particular en relación con el biotipo 1, que se asocia con la mayoría de las infecciones humanas por consumo de pescado o marisco crudo o escasamente cocinado.

Resumiendo, pues, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, guardan relación con procesos humanos de interés desde el punto de vista clínico, y en los tres casos el contagio se produce por ingestión de alimentos de origen marino (pescado o mariscos) o agua contaminados. En el caso de *V. vulnificus*, además, es típico contaminante de heridas abiertas a partir del contacto con agua contaminada o como consecuencia de la manipulación de pescados o mariscos contaminados.

Evaluación de la exposición

1. *V. cholerae*

V. cholerae está ampliamente distribuido en ambientes marinos, aunque los serotipos O1 y O139 relacionados con la producción de la TC se aíslan con frecuencia muy baja. Según la información aportada por la Evaluación de Riesgo Microbiológico de *V. cholerae* O1 y O139 realizada por la FAO, en gambas importadas procedentes de aguas templadas (FAO/OMS, 2005), los procesos de inactivación como el lavado, refrigeración/congelación y cocinado, producen una reducción sustancial de la concentración de *V. cholerae* en el alimento final.

Los factores físico-químicos que limitan el crecimiento de *V. cholerae* fueron cuantificados en 1996 por la ICMSF². La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, pudiendo crecer en un rango entre 10-43 °C. El pH óptimo de crecimiento es de 7,6 aunque el microorganismo puede crecer en un margen entre 5,0 y 9,6. *V. cholerae* puede tolerar concentraciones moderadas de NaCl (4,0%), y su nivel de *a_w* óptimo para crecer es de 0,998 (el rango de crecimiento se puede dar entre 0,970 y 0,998). En cuanto a los factores que le inactivan se cuentan el pH ácido y la desecación, por lo que se recomienda utilizar contenedores de almacenamiento limpios y secos, para no favorecer la transmisión del microorganismo en la cadena producción-consumo.

Asimismo, es un microorganismo termolábil, que presenta un valor D de 2,65 min a 60 °C (ICMSF, 1996). Castro-Rosas y Escartin (2005) estudiaron la supervivencia de *V. cholerae* O1 en gambas frescas sometidas a diferentes temperaturas comprobando la inactivación en 10, 5, 3 y 1 min después de calentamientos de 50, 60, 65 y 70 °C respectivamente.

Kolvin y Roberts (1982) estudiaron el crecimiento de *V. cholerae* en pescado y marisco crudo y cocinado. No se observó crecimiento en gambas, ostras y mejillones crudos, aunque sí hubo crecimiento en marisco cocinado, llegándose a alcanzar niveles de 10¹⁰ ufc/g en langostinos y mejillones cocinados y almacenados a 37 °C. No obstante, a temperaturas de refrigeración, se produce un descenso de la población de *V. cholerae*, aunque parte de la misma permanece viable durante un cierto periodo de tiempo.

En general, partiendo de concentraciones de entre 10³-10⁵ ufc/g se han podido aislar *V. cholerae* viables después de un almacenamiento de cuatro días a 5 °C, y de 9 días a 10 °C. A concentraciones mayores (10⁸ ufc/g) se ha comprobado que *V. cholerae* puede sobrevivir durante 21 días a 7 °C (Reilly y Hackney, 1985). En relación al efecto de las temperaturas de congelación sobre la inhibición de *V. cholerae*, los estudios son contradictorios; según la ICMSF (1996) *V. cholerae* es capaz de sobrevivir durante más de seis meses en condiciones normales de congelación, aunque otros estudios indican que a -20 °C, puede producirse un descenso de 6 log ufc/g de la población microbiana en 30 días de almacenamiento (Nascumento et al., 1998). Parece necesario, por tanto, nuevos estudios a fin de poder establecer conclusiones fiables.

2. *V. parahaemolyticus*

La distribución de *V. parahaemolyticus* en ambientes marinos está relacionada con la temperatura de las aguas. En un estudio reciente (noviembre de 2002 a octubre de 2003) llevado a cabo en Oregón (EE UU) en zonas de cultivo de ostras se observó una correlación positiva entre la presencia de *V. parahaemolyticus* en agua de mar y su temperatura, encontrando las poblaciones más altas en los meses de verano (Duan y Su, 2005). Asimismo, el grado de contaminación de *V. parahaemolyticus* en marisco crudo se asocia con la temperatura del agua; aunque la concentración del microorganismo normalmente está por debajo de 10³ ufc/g en ostras en el momento de su recogida (Kaysner y DePaola, 2000), hay que admitir que se podría superar esta concentración en ostras recogidas en aguas cálidas, multiplicándose después como consecuencia de la exposición a temperaturas elevadas. Algunos estudios han mostrado que las poblaciones de *V. parahaemolyticus* en el caso de ostras sin refrigerar pueden aumentar rápidamente

²International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

entre 50-790 veces dentro de las 24 horas después de la captura, si las ostras se exponen a 26 °C (Gooch et al., 2002). Cook et al. (2002), en un estudio sobre 370 lotes de ostras muestreadas de restaurantes, puestos de venta de ostras, tiendas y mercados de productos pesqueros en Estados Unidos, entre junio 1998-julio 1999, observaron una distribución estacional de *V. parahaemolyticus* con niveles altos (en algunos casos por encima de 1.000 MPN/g) en los meses de verano. Por otra parte, se ha demostrado también que tratamientos térmicos moderados, o tratamientos de congelación y de altas presiones hidrostáticas aplicados a ostras recién capturadas, producen una disminución de entre 5 a 6 unidades logarítmicas con respecto a ostras no procesadas (DePaola et al., 2009).

El crecimiento de *V. parahaemolyticus* a temperaturas entre 15-40 °C puede ser muy rápido, con un tiempo de generación de 8-9 minutos en caldo de cultivo, en condiciones óptimas (37 °C). Miles et al. (1997) desarrollaron un modelo de crecimiento en caldo de cultivo que describe la tasa de crecimiento de *V. parahaemolyticus* en función de la temperatura y la actividad de agua (a_w), con buenas predicciones en alimento. La temperatura mínima para el crecimiento fue 8,3 °C; la máxima de 45,3 °C; y la óptima, entre 37 y 39 °C. *V. parahaemolyticus* puede crecer en un amplio rango de a_w desde 0,936-0,995 (con 9,6-0,4% de NaCl), con un óptimo de 0,982-0,987.

Se dispone, además, de información sobre la viabilidad de *V. parahaemolyticus* en filetes de pescado fresco inoculados con una mezcla de tres cepas del agente, almacenados a 4 y 8 °C durante nueve días, y a -18 °C durante siete semanas (Vausdevan et al., 2002). En las dos temperaturas de refrigeración, con un inóculo inicial de 10^3 y 10^4 ufc/filete, el microorganismo sobrevivió, aunque se observó una reducción significativa al final del período de almacenamiento. En filetes congelados, la reducción fue muy acusada ya en el quinto día de almacenamiento. Los autores de la investigación concluyeron que la refrigeración o congelación, por sí solas, no constituyen métodos válidos para reducir *V. parahaemolyticus* en el pescado, pues tanto el tiempo como la magnitud de la reducción dependen de la concentración inicial del patógeno y de la temperatura de almacenamiento.

Más recientemente se han desarrollado varios modelos de crecimiento de *V. parahaemolyticus* en salmón (Yang et al., 2009) y en preparados de ostras (Yoon et al., 2008). En el caso del salmón, se comprueba que el microorganismo es capaz de crecer a partir de los 12 °C, mientras que a temperaturas inferiores, la concentración microbiana se reduce con el tiempo. A partir de los 16 °C, el crecimiento se presenta muy acelerado, incrementándose dos unidades logarítmicas a 16 °C tras 130 h, mientras que a 20 °C requiere 30 h y a 25 °C, tan sólo 12 h.

En el caso de las ostras, hasta 15 °C decrece la concentración de *V. parahaemolyticus* que comienza a crecer, muy lentamente, a partir de 20 °C (a 20 °C aumenta una unidad logarítmica después de 75 horas de almacenamiento). Un aumento de la temperatura de tan sólo 5 °C (25 °C) produce un crecimiento muy acusado, observándose un incremento de dos unidades logarítmicas en 28 h; a 30 °C el tiempo necesario para producir tal incremento fue de 9,5 h.

Estimación de la dosis de exposición mediante la simulación de escenarios de supervivencia-crecimiento de *V. parahaemolyticus*

Con objeto de representar el comportamiento del microorganismo, se recurre a simular las condiciones reales de mantenimiento refrigerado desde la captura hasta el consumo. A este respecto, tanto en

el caso del salmón como de las ostras, se consideran dos fases: a) desde la captura del producto hasta la toma de muestras en el PIF (Puesto de Inspección Fronterizo), y b) desde este momento hasta el consumo, partiendo de varios niveles hipotéticos de contaminación por *V. parahaemolyticus* y considerando un perfil habitual tiempo-temperatura (Figura 2).

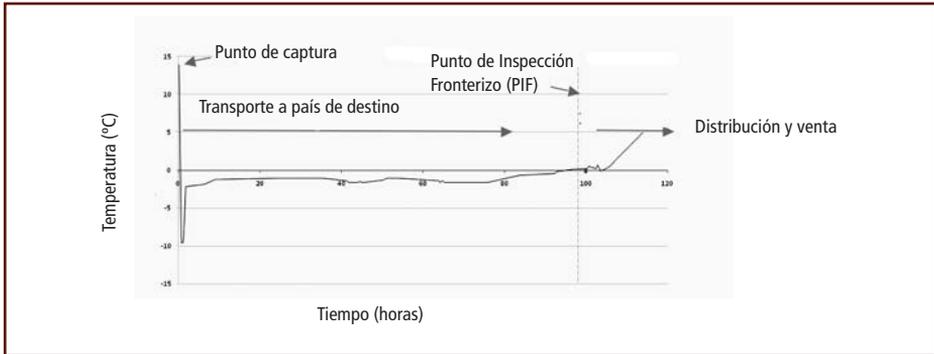


Figura 2. Perfil tiempo-temperatura desde la captura hasta la venta de productos pesqueros importados (merluza). Adaptado de (Zubia, 2008).

En cualquier caso, se contemplan los siguientes considerandos:

1. La temperatura es el factor más importante a controlar en relación al crecimiento de *V. parahaemolyticus*.
2. El nivel de riesgo potencial es en todo caso superior a 10^2 ufc/g en el alimento final, entendiéndose que no existe un riesgo significativo si la concentración es inferior.
3. En el primer escenario (captura-PIF), se asume un perfil tiempo-temperatura de enfriamiento en condiciones reales. En el segundo (PIF-consumo) se aplican modelos de crecimiento de *V. parahaemolyticus* en ostras y salmón a temperatura constante.

Primer escenario (Captura-PIF). Se aplica el modelo descrito por Yang et al. (2009) para cuantificar la inactivación de *V. parahaemolyticus* durante el almacenamiento en frío desde la captura hasta el PIF (Figura 3). La concentración final del microorganismo en el PIF se representa en la Tabla 2.

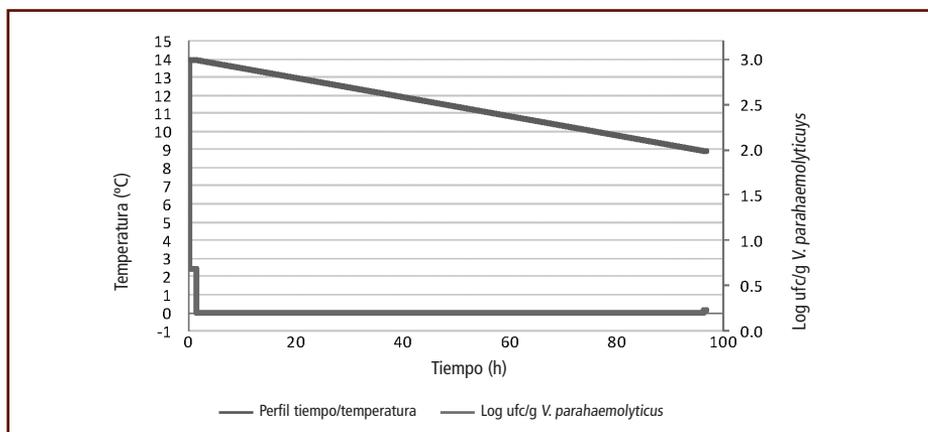


Figura 3. Perfil tiempo-temperatura y evolución de *V. parahaemolyticus* en el producto desde la captura hasta su entrada en el PIF.

Tabla 2. Concentración del microorganismo en el PIF partiendo de diferentes niveles de contaminación en el punto de captura

Concentración inicial <i>V. parahemolyticus</i> (ufc/g)	Concentración en PIF	
	Log ufc/g	ufc/g
1	-1,044	0,090
10	-0,044	0,904
100	0,956	9,043
1.000	1,956	90,426

Partiendo de las cuatro concentraciones hipotéticas que se contemplan en el punto de captura (Tabla 2), la concentración microbiana se reduciría 1,044 unidades logarítmicas, siendo la concentración final alcanzada inferior a 100 ufc/g en todos los casos.

Segundo escenario (PIF-consumo). Partiendo de diferentes concentraciones de *V. parahaemolyticus* en los PIF, se aplican los mencionados modelos tanto para salmón como para ostras, obteniéndose la concentración final alcanzada tras su almacenamiento durante 72 h a diferentes temperaturas (Stroud, 2001) (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración final (log ufc/g) de *V. parahaemolyticus* en salmón y ostras tras el almacenamiento (72 h) previo al consumo a distintas temperaturas

T (°C)	Nivel en PIF (log ufc/g)							
	0		1		2		3	
	salmón	ostras	salmón	ostras	salmón	ostras	salmón	ostras
0	-1,21	-*	-0,22	-*	0,78	-*	1,78	-*
4	-0,74	-*	0,26	-*	1,26	-*	2,26	-*
8	-0,38	-*	0,62	-*	1,62	-*	2,62	-*
10	0,00	-*	1,00	-*	2,00	-*	3,00	-*
12	0,00	-*	1,00	-*	2,00	-*	3,00	-*
14	0,20	-*	1,20	-*	2,20	-*	3,20	-*
16	1,17	-*	2,17	-*	3,17	-*	4,17	-*
20	5,80	0,64	6,80	1,64	7,80	2,64	8,80	3,63
25	6,75	1,30	7,75	2,30	8,75	3,30	9,00	4,30

*No se han encontrado modelos secundarios de supervivencia disponibles para ostras a estas temperaturas.

De los datos de la Tabla 3 se puede observar en el caso de salmón, que no existe crecimiento de *V. parahaemolyticus* por debajo de 12 °C, mientras que entre 16 y 20 °C, el crecimiento se acelera de forma notoria. Concentraciones de inicio en los PIF de 10^1 y 10^2 ufc/g en salmón, aumentarían hasta poco más de 10^2 y de 10^3 ufc/g respectivamente, tras 72 horas de almacenamiento a 16 °C. En el caso de las ostras, a esta temperatura, el microorganismo simplemente no crecería. Experimentos llevados a cabo en ostras a 10 y 15 °C demuestran que la concentración de *V. parahaemolyticus* disminuye a dichas temperaturas y comienza a crecer, muy débilmente, a partir de 20 °C (Yoon et al., 2008). En conclusión, se puede observar que el crecimiento de *V. parahaemolyticus* en ostras es marcadamente más lento que en salmón a las temperaturas de 20 y 25 °C. Por debajo de 20 °C, sólo se ha observado crecimiento en salmón.

Caracterización del riesgo

El riesgo de padecer enfermedad por consumo de productos pesqueros contaminados por *Vibrio* spp. puede calificarse, en términos generales, de bajo o muy bajo, en función de los datos disponibles de identificación, prevalencia y concentración, tanto de *V. cholerae* como de *V. parahaemolyticus*, en productos pesqueros procedentes de terceros países.

Salvo situaciones particulares, la exposición del consumidor a estos patógenos es muy baja, debido al mantenimiento de temperaturas de refrigeración bajo las cuales el microorganismo no crece, a la baja prevalencia de los serotipos patógenos de *Vibrio* en productos de la pesca, y al consumo muy limitado de pescado o marisco crudo en España. De hecho, los brotes de esta etiología son de carácter esporádico. No obstante, una razón para explicar los brotes producidos en los últimos años, pudiera ser la pérdida de control de las temperaturas, pues aún partiendo de concentraciones del patógeno muy bajas en la captura o en los PIF, las temperaturas elevadas pueden producir un aumento considerable en la concentración, pudiéndose alcanzar niveles de riesgo para la salud.

Por otro lado existen evidencias de la capacidad de especies de *Vibrio*, para mantenerse en estado viable pero no cultivable. En este estado las bacterias mantienen su viabilidad y su potencial patogénico pero no son recuperadas como unidades formadoras de colonia en los habituales métodos de recuento en placa. En el caso de *V.cholerae* O1 se ha demostrado su capacidad de entrar en este estado en condiciones de escasez de nutrientes u otras situaciones ambientales desfavorables (Alam et al., 2007) (Binsztein et al., 2004).

1. Estimación del tiempo en alcanzar niveles de riesgo de *V. parahemolyticus* en el momento del consumo

Con los modelos de crecimiento descritos, se puede calcular el tiempo necesario para alcanzar niveles de riesgo en el momento de consumo (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 ufc/g), partiendo de concentraciones de *V. parahemolyticus* encontradas en los PIF (Tabla 4).

Tabla 4. Tiempo necesario (horas) para alcanzar determinados niveles de *V. parahaemolyticus* tras el almacenamiento a diferentes temperaturas

		Concentraciones de inicio de <i>V. parahaemolyticus</i> (ufc/g)							
T (°C)	Nivel final (ufc/g)	1 ufc/g		10 ufc/g		100 ufc/g		1.000 ufc/g	
		salmón fresco	ostras	salmón fresco	ostras	salmón fresco	ostras	salmón fresco	ostras
10 °C	10 ² ufc/g	> 1.000	-*	> 1.000	-	0,000	0,000	0,000	0,000
	10 ³ ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	0,000	0,000
	10 ⁴ ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-
	10 ⁵ ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-
	10 ⁶ ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-
12 °C	10 ² ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	0,000	0,000	0,000	0,000
	10 ³ ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	0,000	0,000
	10 ⁴ ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-
	10 ⁵ ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-
	10 ⁶ ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-
14 °C	10 ² ufc/g	378	-	230	-	0,000	0,000	0,000	0,000
	10 ³ ufc/g	527	-	379	-	230	-	0,000	0,000
	10 ⁴ ufc/g	676	-	529	-	379	-	230	-
	10 ⁵ ufc/g	826	-	678	-	529	-	379	-
	10 ⁶ ufc/g	975	-	827	-	678	-	529	-
16 °C	10 ² ufc/g	92	-	56	-	0,000	0,000	0,000	0,000
	10 ³ ufc/g	128	-	92	-	56	-	0,000	0,000
	10 ⁴ ufc/g	164	-	128	-	92	-	56	-
	10 ⁵ ufc/g	200	-	165	-	128	-	92	-
	10 ⁶ ufc/g	237	-	201	-	165	-	128	-
20 °C	10 ² ufc/g	23	147	14	89	0,000	0,000	0,000	0,000
	10 ³ ufc/g	31	206	23	148	14	89	0,000	0,000
	10 ⁴ ufc/g	40	265	32	207	23	148	14	89
	10 ⁵ ufc/g	49	325	41	266	32	207	23	148
	10 ⁶ ufc/g	58	384	50	326	41	266	32	207
25 °C	10 ² ufc/g	9	88	5	52	0,000	0,000	0,000	0,000
	10 ³ ufc/g	12	124	9	88	5	52	0,000	0,000
	10 ⁴ ufc/g	15	160	12	124	9	88	5	52
	10 ⁵ ufc/g	19	196	15	161	12	124	9	88
	10 ⁶ ufc/g	22	233	19	197	15	160	12	124

*Según los modelos de predicción existentes en la bibliografía, no hay crecimiento a temperaturas inferiores a 20 °C.

Como puede observarse en la Tabla 4, el tiempo necesario en alcanzar un determinado nivel de riesgo viene determinado por la concentración inicial y la temperatura de almacenamiento para cada tipo de producto pesquero. A 20 °C o más, concentraciones en ostras de 1, 10 y 10² ufc/g de *V. parahaemolyticus* en los PIF, alcanzarían el nivel de 10⁶ ufc/g, respectivamente en aproximadamente 16, 14 y 11 días respectivamente. En el caso del salmón se observan tiempos más cortos. Así a temperaturas de 20 °C y partiendo de los mismos niveles iniciales (1, 10 y 10² ufc/g) se alcanzarán niveles de 10⁶ ufc/g en tiempos inferiores a los 2,5 días. A temperaturas de 12 °C o inferiores se necesitarían más de 40 días en alcanzarse dicha dosis de exposición.

2. Estimación de la probabilidad de enfermar asociada al consumo de productos pesqueros contaminados con *V. parahaemolyticus*

Para estimar la probabilidad de enfermar asociada al consumo de productos pesqueros, se aplicó el modelo D-R, descrito en el apartado "Caracterización del Peligro", sobre la concentración de *V. parahaemolyticus* en el alimento antes de su consumo (Tabla 3) y en relación a la ración consumida. Las unidades de consumo habitual pueden venir expresadas como medidas caseras, como porciones o raciones típicas o medias o como unidades convencionales. En este caso, se ha considerado un tamaño medio de ración de 100 g de salmón y ostras.

Las probabilidades obtenidas revelan que la temperatura de almacenamiento es un factor crítico, junto con el nivel de contaminación inicial. En el caso del salmón mantenido a 14 °C y asumiendo un nivel de contaminación de *V. parahaemolyticus* de 10³ ufc/g en PIF la probabilidad de enfermar es del 6,64%, mientras que un almacenamiento a 16 °C supone un incremento superior al 36,66% y por encima de 20 °C, la probabilidad es superior al 90%. En el caso de las ostras, como el crecimiento de *V. parahaemolyticus* es menor, asumiendo el peor caso posible en el modelo (contaminación inicial de 10³ ufc/g en PIF seguido de un almacenamiento a 25 °C), el valor máximo alcanzado de probabilidad de enfermar llega al 42,77%.

La probabilidad de contraer enfermedad difirió de forma notoria en función de los distintos niveles de contaminación de *V. parahaemolyticus* en los PIFs (1, 10, 100 y 1.000 ufc/g); por ejemplo, una reducción de la contaminación de 10³ a 10² ufc/g en el salmón produce una reducción de la probabilidad del 920%, suponiendo un almacenamiento a 14 °C y en el caso de las ostras, la misma reducción del grado de contaminación hace que la probabilidad disminuya hasta en un 815%, asumiendo un almacenamiento a 20 °C. A partir de estos resultados, se desprende que la concentración máxima admisible de *V. parahaemolyticus* en los PIFs no debe superar 10² ufc/g, ya que niveles superiores producen un incremento muy significativo de la probabilidad de contraer enfermedad.

Consideraciones finales derivadas del análisis de los datos y de la información disponible

En España, los casos de enfermedad producida por *Vibrio* spp. se han limitado a brotes esporádicos. De esta afirmación podría deducirse que las medidas de control vigentes hasta ahora (detección de *V. cholerae* serotipo O:1 y O:139, y concentraciones permitidas hasta 10² ufc/g de *V. parahaemolyticus*) son eficaces. Su anulación podría tener consecuencias indeseables, sobre todo tratándose de productos de la pesca importados de países terceros (principalmente asiáticos), con una elevada incidencia de la enfermedad y marcado protagonismo de *V. parahaemolyticus* con respecto a otros patógenos vehiculados por alimentos.

Por otra parte, pese a que el Reglamento (CE) N° 2073/2005 no establece criterio microbiológico específico para *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, "en función de las pruebas científicas disponibles" (aunque se refiere a la necesidad de elaborar métodos fiables, en el caso de *V. parahaemolyticus*), sí recomienda el establecimiento de códigos de prácticas para la aplicación de "Buenas Prácticas de Higiene". Además, el documento de la SCVPH (2001) se refiere a que la mayoría de los brotes producidos en Europa por *V. parahaemolyticus* se deben al consumo de pescado y mariscos importados, especialmente de Asia, consumido crudo o cocinado inadecuadamente o recontaminado, por lo que parece oportuno el mantenimiento del control del pescado y derivados procedentes de países terceros.

Respecto de la situación vigente en las legislaciones de otros países, en el caso de *V. cholerae*, mayoritariamente los límites aplicados establecen tolerancia cero. Por ejemplo, la FDA en Estados Unidos en el caso de productos pesqueros listos para el consumo, establece ausencia en 25 g (FDA, 1998); la *Australian New Zealand Food Standards Code* (ANZSC), define un criterio $n=5; c=0$ para crustáceos crudos y cocidos (ANZSC, 2001) y en algunos países europeos, como el Reino Unido, se mantiene también un criterio de tolerancia cero definido por su ausencia en 25 g. En todos los casos no se hace distinción entre grupos O1 y no O1 (PHLS, 1996).

En el caso de *V. parahaemolyticus*, existen criterios microbiológicos y/o recomendaciones en distintos puntos de la cadena alimentaria. En Holanda, por ejemplo, se aceptan niveles inferiores a 10^2 ufc/g en el momento de venta para productos pesqueros importados congelados, cocinados o crudos (SCVPH, 2001). En el Reino Unido la *Health Protection Agency* (HPA), para productos listos para el consumo, también en el punto de venta, consideran insatisfactorios niveles superiores a 10^2 ufc/g, y potencialmente peligrosos por encima de 10^3 ufc/g (HPA, 1996). En el caso de Estados Unidos, la FDA (1998) considera el límite máximo un nivel de 10^4 ufc/g, incluyendo *V. parahaemolyticus* Kanagawa positivo o negativo. En Australia y Nueva Zelanda, la ANZSC establece como criterio estándar de obligado cumplimiento en manufactura y venta $n=5; c=2; m=10^2; M=10^3$ (ANZSC, 2001). Finalmente, Japón ha definido un estándar para ostras crudas que tolera valores inferiores a 10^2 ufc/g (CCFH, 2002). Concluyendo pues, en nuestro caso podría establecerse como apropiado un límite máximo de 10^2 ufc/g. para *V. parahaemolyticus*.

Aunque existe muy poca información respecto a la dosis infectiva (infecciosa) de *V. parahaemolyticus* y en todo caso depende de otros factores (como el estado inmune del consumidor), algunos organismos internacionales se han pronunciado por valores de 10^6 ufc (FDA CFSAN, 2000). No obstante, a tenor de la investigación de brotes que tuvieron lugar en Canadá y Estados Unidos durante 1997 y 1998 por consumo de ostras, en el que el análisis de muestras procedentes de zonas de captura implicadas en los brotes, evidenció valores inferiores a 1.000 ufc/g, algunas de ellas con niveles tan bajos como de 100 ufc/g de *V. parahaemolyticus* en carne de ostra, se sugirió que la enfermedad podría aparecer como consecuencia de la exposición al agente a niveles mucho más bajos de los que habitualmente se habían considerado (CDC, 1999). Esto no debe cuestionar la propuesta del criterio ($m=10^2$ ufc/g), ya que aún teniendo en cuenta que dosis inferiores a la DI_{50} pudieran causar enfermedad, aunque con una menor probabilidad, estas pueden explicar la aparición de casos aislados o brotes esporádicos que pudieran estar asociados a tan bajas dosis. Por otra parte, dicho criterio debe estar especialmente condicionado al mantenimiento de la cadena del frío para proporcionar un nivel adecuado de protección al consumidor. Así, partiendo de los niveles encontrados en los PIFs, por ejemplo 10^2 ufc/g, solo en el supuesto de temperaturas de mantenimiento

inadecuadas (más de 14 °C en el caso del salmón y superiores a 20 °C en el caso de las ostras) pueden conllevar riesgo, y por debajo de ellas, se obtienen probabilidades de enfermar inferiores al 1%.

Conclusiones del Comité Científico

1. La aplicación de criterios microbiológicos en los PIFs, como medida adicional y complementaria de control, se considera justificada y muy adecuada, en relación con la importación de pescado y productos pesqueros procedentes de terceros países, por lo que se refiere a la presencia de microorganismos patógenos del género *Vibrio*.
2. Respecto de *V. cholerae*, se recomienda aplicar, igual que sucede en otros países, un criterio de tolerancia cero (ausencia en 25 g) sin distinción entre serotipos. En el caso de serotipos distintos de O:1 y O:139 se recomienda identificar los productos que puedan presentar un mayor riesgo para el consumidor y adoptar medidas de vigilancia efectivas sobre los que pudieran ser aislados de muestras ambientales, clínicas o de origen alimentario.
3. Respecto de *V. parahaemolyticus*, se considera adecuado la aplicación de un límite máximo de 10² ufc/g, por otra parte, el más común en la normativa de distintos países. Igualmente consideramos que el criterio microbiológico y plan de muestreo establecido para *V. parahaemolyticus* en los PIFs ($n=5$, $c=0$, $m=M=10^2$ ufc/g) es adecuado y suficiente. En cualquier caso, a partir de capturas procedentes de zonas de riesgo, debería establecerse un plan de vigilancia especial en relación con algunas de las serovariantes principales del O3:K6 surgidas en los últimos años en relación con brotes de enfermedad, como paso previo para la adopción de otro tipo de criterios.
4. Se recomienda extender, igualmente, la vigilancia de pescado y mariscos procedentes de zonas de riesgo a *V. vulnificus*. Desde el punto de vista epidemiológico, el dato de su inclusión en la lista de riesgos sería de gran utilidad y, en particular, la detección del biotipo 1, que se asocia en mayor medida a procesos debidos a consumo de pescado. Sobre esta base, la advertencia a los grupos de consumidores de riesgo (pacientes de enfermedades hepáticas, enfermos crónicos, pacientes inmunodeprimidos, etc.), de eliminar de la dieta este tipo de alimentos o en todo caso, garantizar que su preparación culinaria eliminase el agente, sería una consecuencia deseable. Igualmente se recomienda mantener cierta cautela respecto de las mismas zonas (de riesgo) en lo que se refiere a cualquiera otra especie de *Vibrio*, en particular las consideradas patógenas (además de las referidas, *Vibrio alginoliticus*, *V. fluviales* y *V. harveyi*).
5. Se destaca la importancia crítica de la temperatura de mantenimiento del pescado y productos de la pesca. El mantenimiento de estos productos a temperaturas de refrigeración correctas, proporcionan un nivel adecuado de protección al consumidor, ya que, incluso en abusos de temperatura, se necesitarían más de 28 días en alcanzarse la dosis infectiva de 6,5 log ufc de *V. parahaemolyticus* en salmón mantenido a 14 °C, mientras que en ostras sólo se evidencia crecimiento a partir de 20 °C. La pérdida de la cadena de frío, justifica que la mayoría de los brotes descritos presenten carácter esporádico.
6. En España, en función de los datos disponibles sobre el consumo de pescado y productos de la pesca, y de los datos sobre identificación, prevalencia y concentración de microorganismos patógenos del género *Vibrio*, el riesgo de padecer enfermedad por el consumo de productos pesqueros contaminados, puede calificarse con carácter general de muy bajo.

Referencias

- Alam, M., Chowdhury, W.B., Bhuiyan, N.A., Islam, A., Hasan, N.A., Balakrish Nair, G., Watanabe, H., Siddique, A.K., Huq, A., Sack, B., Akhter, N.A., Grim, C.J., Kam, M., Luey, C.K.Y., Endtz, H.Ph., Cravioto, A. y Colwell, R.R. (2009). Serogroup, virulence and genetic traits of *Vibrio parahaemolyticus* in the estuarine ecosystem of Bangladesh. *Applied Environmental Microbiology*, 75 (19), pp: 6268-6274.
- Alam, M., Sultana, M., Nair, G.B., Siddique, A.K., Hasan, N.A., Sack, R.B., Sack, D.A., Ahmed, K.U., Sadique, A., Watanabe, H., Grim, C. J., Huq, A. y Colwell, R.R. (2007). Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104 (45), pp: 17801-17806.
- Anónimo (2005). Food Poisoning in Taiwan, 1981-2003. Department of Health, Taiwan. Disponible en: http://food.doh.gov.tw/chinese/academic/academic2_1.htm [acceso: 2-7-06].
- ANZSC (2001). Australian New Zealand Food Standards Code. User guide to Standard 1.6.1-Microbiological Limits for Food with additional guideline criteria.
- Austin, B. (2009). *Vibrios* as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*. (in press: doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.015).
- Austin, B. y Austin, D.A. (2007). Bacterial fish pathogens. En libro: *Diseases of farmed and wild fish*. Godalming, Springer Praxis.
- Baffone, W., Tarsi, R., Pane, L., Campana, R., Repetto, B., Mariottini, G.L. y Pruzzo, C. (2006). Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity associated properties. *Environmental Microbiology*, 8 (7), pp: 1299-1305.
- Balakrish Nair, G. y Hormázabal, J.C. (2005). The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic. *Revista Chilena de Infectología*, 22 (2), pp: 125-130.
- Bennish, M.L. (1994). Cholera: Pathophysiology, clinical features and treatment. En libro: *Vibrio cholerae and cholera: Molecular to Global Perspectives*. Wachsmuth, I.K., Blake P.A. y Olsvik, B. Washington D.C., American Society for Microbiology Press.
- Binsztein, N., Costagliola, M.C., Pichel, M., Jurquiza, V., Ramírez, F.C., Akselman, R., Vacchino, M., Huq, A. y Colwell, R. (2004). Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Applied Environmental Microbiology*, 70 (12), pp: 7481-7486.
- Bisharat, N., Agmon, V., Finkelstein, R., Raz, R., Ben-Dror, G., Lemer, L., Soboh, S., Colodner, R., Cameron, D.N., Wykstra, D.L., Serdlow, D.L. y Farmer III, J.J. (1999). Clinical, epidemiological and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Lancet*, 354 (9188), pp: 1421-1424.
- Blake, P.A., Wachsmuth, K., Davis, B.R., Bopp, C.P., Chaiken, B.P. y Lee, J.V. (1983) Choleraogenic *V. cholerae* O1 strains from Mexico identical to United States isolates. *Lancet*, 322 (8355), pp: 912.
- Castro-Rosas, J. y Escartin, E.F. (2005). Increased tolerance of *Vibrio cholerae* O1 to temperature, pH, or drying associated with colonization of shrimp carapaces. *International Journal of Food Microbiology*, 102 (2), pp:195-201.
- CCFH (2002). Codex Committee on Food Hygiene. Discussion paper on risk management strategies for *Vibrio* spp. in seafood. CX/FH 03/5-Add.3. Disponible en: http://www.cofexalimentarius.net/ccfh35/fh03_01e.htm [acceso: 8-2-10].
- CDC (1991). Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiological notes and reports cholera-New York 1991. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 40 (30), pp: 516-518.
- CDC (1998). Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters-Pacific Northwest, 1997. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 47 (22), pp: 457-462.
- CDC (1999). Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound-Connecticut, New Jersey and New York, 1998. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 48 (3), pp: 48-51.

- CDC (2006). Centers for Disease Control and Prevention. *Vibrio parahaemolyticus* Infections Associated with Consumption of Raw Shellfish-Three States, 2006. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 55 (31), pp: 1-2.
- Chatterjee, B.D., Mukherjee, A. y Sanyal, S.N. (1984). Enteroinvasiveness model of *Vibrio parahaemolyticus*. *Indian Journal of Medical Research*, 79, pp: 151-158.
- Chiou, C.S., Hsu, S.Y., Chiu, S.I., Wang, T.K. y Chao, C.S. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (12), pp: 4621-4625.
- Cho, S.H., Shin, H.H., Choi, Y.H., Park, M.S. y Lee, B.K. (2008). Enteric bacteria isolated from acute diarrheal patients in the Republic of Korea between the year 2004 and 2006. *Journal of Microbiology*, 46 (1), pp: 325-330.
- CAC (1999). Codex Alimentarius Commission. Principles and guidelines for the conduct of Microbiological Risk Assessment. Codex Alimentarius Commission, Washington, D.C., E.U.
- Colwell, R.R. (1996). Global climate and infectious diseases: the cholera paradigm. *Science*, 274 (5295), pp: 2025-2031.
- Cook, D.W., O'Leary, P., Hunsucker, J.C., Sloan, E.M., Bowers, J.C., Blodgett, R.J. y DePaola, A. (2002). *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in US retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999. *Journal of Food Protection*, 65 (1), pp: 79-87.
- Dalsgaard, A., Huss, H.H., H-Kithikun, A. y Larsen, J.L. (1995). Prevalence of *Vibrio cholerae* and *Salmonella* in a major shrimp production area in Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 28, pp: 101-113.
- Daniels, N.A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruise, S., Ray, B., Hammond, R.M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N.H., Griffin, P.M. y Slutsker, L. (2000a). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *Journal of Infectious Diseases*, 181 (5), pp: 1661-1666.
- Daniels, N.A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShan, A.L., Del Rosario, L., Baldwin, T., Kingsley, M.A., Puhf, N.D., Wells, J.G. y Angulo, F.J. (2000b). Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters. *Journal of the American Medical Association*, 284 (12), pp: 1541-1545.
- Deepanjali, A., Kumar, H.S., Karunasagar, I. y Karunasagar, I. (2005). Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (7), pp: 3575-3580.
- DePaola, A., Cachicas, V., Cornelius, A., Croci, L., Espejo, R., Hervio-Heath, D., Karunasager, I., Hara-Kudo, Y., Liu, J., Madigan, T., Martinez-Urtaza, J., Rangdale, R., Suffredini, E. y Jones, J. (2009). Evaluation of international PCR method performance for detection of *Vibrio parahaemolyticus*. En libro: *7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety*. Conference handbook, 14-19 Junio, 2009; Nantes.
- DePaola, A., Kaysner, C.A., Bowers, J.C. y Cook, D.W. (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters following outbreaks in Washington, Texas and New York (1997, 1998). *Applied and Environmental Microbiology*, 66, pp: 4649-4654.
- DePaola, A., Ulaszek, J., Kaysner, C.A., Tenge, B.J., Nordstrom, J.L., Wells, J., Puhf, N. y Gendel, S.M. (2003). Molecular, serological and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, pp: 3999-4005.
- Drake, S.L., DePaola, A. y Jaykus, L.A. (2007). An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6, pp: 120-144.
- Duan, J. y Su, Y.C. (2005). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two Oregon oyster-growing bays. *Journal of Food Science*, 70, pp: M58-M63.
- FAO/OMS (2005). Risk assessment of choleraogenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 in warm-water shrimp in international trade. Interpretative summary and technical report. Microbiological Risk Assessment series N°. 9. ISSN 1726-5274.
- Farama, E., Lesne, J., Touron, A. y Wallet, F. (2008). Shellfish and non-cholera vibrios in coastal waters: characterization of human exposure. *Environment, Risques & Sante*, 7, pp: 191-201.
- Faruque, S.M., Albert, M.J., y Mekalanos, J.J. (1998). Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, pp: 1301-1314.

- FDA (1998). Food and Drug Administration. FDA and EPA Guidance Levels. Appendix 5. En libro: *Fish and Fishery Products, Hazards and Control Guides, 2nd edition*, Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Centre for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington DC, pp. 245-248.
- FDA (2005). Food and Drug Administration. Quantitative Risk Assessment on the Public Health Impact of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Raw Oysters. Disponible en: http://www.cfsan.fda.gov/_dms/vpra-toc.html, [acceso 18-3-2010].
- FDA/CFSAN (2000). Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/RiskAssessmentSafetyAssessment/ucm050421.htm> [acceso: 18-03-2010].
- Fouz, B., Roig, F.J. y Amaro, C. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of a new fish-virulent *Vibrio vulnificus* serovar that lacks potential to infect humans. *Microbiology*, 153 (6), pp: 1926-1934.
- Glass, R.I. y Black, R.E. (1992). The epidemiology of cholera. En libro: *Cholera*. Barua, D. y Greenough III, W.B., New York, Plenum Publishers Co., pp. 129-154.
- González-Escalona, N., Cachicas, V., Acevedo, C., Riaseco, M.L., Vergara, J.A., Cabello, F., Romero, J. y Espejo, R.T. (2005). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhoea, Chile, 1998 and 2004. *Emerging Infectious Diseases*, 11, pp: 129-131.
- Gooch, J.A., DePaola, A., Bowers, J. y Marshall, D.L. (2002). Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *Journal of Food Protection*, 65, pp: 970-974.
- Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M. y Karunasagar, I. (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments: implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 102, pp: 151-159.
- Haldari, S., Chatterjee, S., Asakura, M., Viyakumaran, M. y Yamasak, S. (2007). Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* (non O1 and O139) from moribund shrimp (*Penaeus monodon*) and experimental challenge study against post-larvae and juveniles. *Annals of Microbiology*, 57, pp: 55-60.
- Herrington, D.A., Hall, R.H., Losonsky, G., Mekalanos, J.J., Taylor, R.K. y Levine, M.M. (1988). Toxin, toxin-coregulate4d pili, and the toxR regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *Journal of Experimental Medicine*, 168, pp: 1487-1492.
- Honda, S., Goto, I., Minematsu, I., Ikeda, N., Asano, N., Ishibashi, M., Kinoshita, Y., Nishibuchi, M., Honda, T. y Miwatani, T. (1987). Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. *Lancet*, I, pp: 331-332.
- Honda, T., Ni, Y. y Miwatani, T. (1988). Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolates of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 56, pp: 961-965.
- Hornstrup, M.K. y Gahrnhansen, B. (1993). Extraintestinal infections caused by *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in a Danish county, 1987-1992. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 25, pp: 735-740.
- ICMSF (1996). International Commission for Microbiological Specifications for Foods. *Vibrio cholerae*. En libro: *Microorganisms in Foods: 5. Characteristics of Microbial Pathogens*. London, Blackie Academic and Professional, pp. 414-425.
- Jiang, S., Chu, W. y Fu, W. (2003). Prevalence of cholera toxin (ctxA and zot) among non-O1/O139 *Vibrio cholerae* strains from Newport Bay, California. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12), pp: 7541-7544.
- Jones, M.K. y Oliver, J.D. (2009). *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infection and Immunity*, 77 (5), pp: 1723-1733.
- Kaper, J.B., Morris, J.G. y Levine, M.M. (1995). Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, pp: 48-86.
- Kaysner, C.A. y DePaola, A. (2000). Outbreaks of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis from raw oyster consumption: assessing the risk of consumption and genetic methods for detection of pathogenic strains. *Journal of Shellfish Research*, 19, pp: 657.
- Kaysner, C.A. y DePaola, A. (2001). *Vibrio*. En libro: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Downes, F.P. e Ito, K. Washington, DC. American Public Health Association. pp. 405-420.

- Klontz, K.C., Lieb, S., Schreiber, M., Janowski, H.T., Baldy, L.M. y Gunn, R.A. (1988). Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. Clinical and epidemiological features in Florida cases, 1981-1987. *Annals of Internal Medicine*, 109, pp: 318-323.
- Kolvin, J.L. y Roberts, D. (1982). Studies on the growth of *Vibrio cholerae* biotype El Tor and biotype Classical in foods. *Journal of Hygiene Cambridge*, 89, pp: 243-252.
- Levine, M.M., Black, R.E., Clements, M.L., Lanata, C., Sears, S., Honda, T., Young, C.R. y Finkelstein, R.A. (1984). Evaluation in humans of attenuated *Vibrio cholerae* El Tor Ogawa strain Texas Star-S.R as a live oral vaccine. *Infection and Immunity*, 43, pp: 515-522.
- Levine, M.M., Black, R.E., Clements, M.L., Nalin, D.R., Cisneros L. y Finkelstein, R.A. (1981). Volunteer studies in development of vaccines against cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli*: a review. En libro: *Acute enteric infections in children. New prospects for treatment and prevention*. Holme, J. et al. Amsterdam (The Netherlands) Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp: 443-459.
- Liu, X., Chen, Y., Wang, X. y Ji, R. (2004). Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001—national foodborne disease surveillance system. *Journal of Hygiene Research*, 33, pp: 725-727.
- Lozano-León, A., Torres, J., Osorio, C.R. y Martínez-Urtaza, J. (2003). Identification of thdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from and outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiology Letters*, 226, pp: 281-284.
- Mahmud, Z.H., Beogi, S.B., Kassu, A., Mai Huong, B.T., Jahid, I.K., Islam, M.S. y Ota, F. (2008). Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Chanel, Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 64, pp: 209-218.
- Manfrin, A., Friso, S., Perin, R., Quattieri, K. y Bovo, G. (2001). Tropical fish importation from third countries: the potential risk of introducing human and aquatic animal pathogens. En libro: *Proceedings, Risk Analysis in Aquatic Animal Health*. Rodgers, C.J. Paris. Office Internationale de Epizooties, pp: 167-170.
- Martínez-Urtaza, J., Lozano-León, A., DePaola, A., Ishibashi, M., Shimada, K., Nishibuchi, M. y Liebana, E. (2004). Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American Pandemic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (10), pp: 4672-4678.
- Martínez-Urtaza, J., Lozano-León, A., Varela-Pet, J., Trinanes, J., Pazos, Y. y García-Martín, O. (2008). Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (1), pp: 265-274.
- Martínez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C. y Pousa, A. (2005). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11, pp: 1319-1320.
- Miles, D.W., Ross, T., Olley, J. y McMeekin, T.A. (1997). Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and aw on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 3 (2-3), pp: 133-142.
- Molenda, J.R., Johnson, W.G., Fishbein, M., Wentz, B., Mehlman, I.J. y Dadisman Jr., T.A. (1972). *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland: laboratory aspects. *Applied Microbiology*, 24, pp: 444-448.
- Molero, X., Bartolome, R.M., Vinuesa, T., Guarner, L., Accarino, A., Casellas, F. y Garcia, R. (1989). Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain. Presentation of 8 cases. *Medicina Clínica* (Barcelona), 92, pp: 1-4.
- Morris, J.G. (2003). Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. *Clinical Infectious Diseases*, 37, pp: 272-280.
- Nascimento, D.R., Viera, R.H., Almeida, H.B., Patel, T.R. y Laria, S.T. (1998). Survival of *Vibrio cholerae* O1 strains in shrimp subjected to freezing and boiling. *Journal of Food Protection*, 61, pp: 1317-1320.
- Nishibuchi, M. y Kaper, J.B. (1995). Minireview. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infection and Immunity*, 63, pp: 2093-2099.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A.K., Grag, S., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B. y Nishibuchi, M. (1997). Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India,

- and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travellers arriving in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, pp: 3150-3155.
- Oliver, J.D. y Kaper, J.B. (1997). *Vibrio species*. En libro: *Food microbiology- Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., y Montville, T.J. Washington D.C. ASM Press. pp: 228-264.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Santarelli, S., Masini, L., Di Trani, V., Canonico, C., Pianetti, A., Tega, L., y Carraturo, A. (2009). Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 132, pp: 47-53.
- PHLS (1996). Public Health Laboratory Service. Microbiological guidelines for some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. PHLS Microbiol. Dig.k 13, pp: 41-43.
- Popovic, T., Fields, P.I., Olsvik, O., Wells, J.G., Evins, G.M., Caameron, D.N., Farmer III, J.J., Bopp, C.A., Wachsmuth, K., Sack, R.B., Albert, M.J., Nair, G.B., Shimada, T. y Feeley, J.C. (1995). Molecular subtyping of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 causing epidemic cholera in India and Bangladesh, 1992-1993. *The Journal of Infectious Diseases*, 171, pp: 122-127.
- Reilly, L.A. y Hackney, C.R. (1985). Survival of *Vibrio cholerae* during storage in artificially contaminated seafoods. *Journal of Food Science*, 50, pp: 838-839.
- Robert-Pillot, A., Guénolé, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M. y Quilici, M.L. (2004). Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *International Journal of Food Microbiology*, 91, pp: 319-325.
- Sanyal, S.C. y Sen, P.C. (1974). Human volunteer study on the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*. En libro: *International Symposium on Vibrio parahaemolyticus*. Fujimo, T., Sakaguchi, G., Sakazaki, R., y Takeda, Y. Tokyo, pp: 227-230.
- SCVMPH (2001). European Commission Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health. Opinion on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in raw and undercooked seafood). Disponible en: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out45_en.pdf [acceso 18-3-2010].
- Shirai, H., Ito, H., Hirayama, T., Nakamoto, Y., Nakabayashi, N., Kumagai, K., Takeda, Y. y Nishibuchi, M. (1990). Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infection and Immunity*, 58, pp: 3568-3573.
- Stroud, G.D. (2001). Handling and Processing Oysters. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food/Torry Research Station. Torry Advisory Note. Nº. 84. Disponible en: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5954e/x5954e00.htm> [acceso 18-3-2010].
- Swaminathan, T.R., Rathore, G., Sood, N., Abidi, R. y Likra, W.S. (2007). *Vibrio cholerae* non O1 and non O139 serogroup isolated from ornamental fish in India. *Indian Veterinary Journal*, 84, pp: 1023-1025.
- Vausdevan, P., Marek, P., Daigle, S., Hoagland, T. y Venkitanarayanan, K.S. (2002). Effect of chilling and freezing on survival of *Vibrio parahaemolyticus* on fish fillets. *Journal of Food Safety*, 22, pp: 209-217.
- Vuddhakul, V., Chowdhury, A., Laohaprerthisan, V., Pungrasamee, P., Patararungrong, N., Thianmontri, P., Ishibashi, M., Matsumoto, C. y Nishibuchi, M. (2000). Isolation of a pandemic O3:K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Applied Environmental Microbiology*, 66, pp: 2685-2689.
- Watnick, P.I., Fullner, K.K. y Kolter, R. (1999). A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *Journal Bacteriology*, 181, pp: 3606-3609.
- Wong, H.C., Liu, S.H., Ku, L.W., Lee, I.Y., Wang, T.K., Lee, Y.S., Lee, C.L., Kuo, L.P. y Shin, D.Y.C. (2000). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *Journal of Food Protection*, 63, pp: 900-906.
- Yang, Z., Jiao, X., Li, P., Pan, Z., Huang, J., Gu, R., Fang, W. y Chao, G. (2009). Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon meat as a function of temperature. *Food Microbiology*, 26, pp: 606-614.
- Yoon, K.S., Min, K.J., Jung, Y.J., Kwon, K.Y., Lee, J.K. y Oh, S.W. (2008). A model of the effect of temperature on the growth of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Food Microbiology*, 25, pp: 635-641.
- Zubia, P. (2008). Nuevas tecnologías aplicadas a la trazabilidad de productos a temperatura controlada. Disponible en <http://conferencias.logitransonline.com/web/pages/ponencias/lunes/itene/Pablo%20Zubia%20-%20ITENE.ppt> [acceso: 18-3-2010].

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferri, M^º Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-002

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 17 de febrero de 2010

Grupo de Trabajo

Lucas Domínguez Rodríguez (Coordinador)
Juan José Badiola Díez
Alberto Cepeda Sáez
Albert Más Barón
Elias Rodríguez Ferri
Gonzalo Zurera Cosano
Sonia Téllez Peña (C. Externa)

37

revista del comité científico n.º 12

Resumen

En las últimas dos décadas, se ha puesto de manifiesto que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente exclusivamente de forma libre, comportándose como seres unicelulares, como se creía, sino que, en muchas ocasiones, pueden encontrarse formando parte de comunidades microbianas con un sistema de organización más típico de los organismos coloniales, creciendo adheridas a superficies y embebidas en matrices extracelulares que ellas mismas sintetizan. A estas estructuras biológicas se las denomina biofilms.

La formación de biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos que permite incrementar sus posibilidades de supervivencia en el medio ambiente y supone la aparición de un nuevo concepto de "bacteria" como organismo unicelular que puede ser capaz de formar estructuras complejas con interrelaciones entre sus individuos que están muy próximas al comportamiento de los organismos pluricelulares. El estudio de estas poblaciones microbianas organizadas se incluiría como un nuevo campo de doctrina dentro de la microbiología.

El mecanismo de formación de los biofilms es muy complejo, dependiendo de numerosos factores tanto intrínsecos al microorganismo como propios del medio que lo rodea. Este hecho hace que sea muy difícil generalizar en cuanto a las características específicas de estas comunidades bacterianas y por lo tanto complica su comprensión. Sin embargo, una consecuencia de la formación de estas estructuras es que los métodos habituales de control y eliminación (desinfectantes, antibióticos, etc.) de las formas libres (planctónicas) de las bacterias se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias del biofilm.

Hoy día sabemos que los biofilms no son una rareza, si no que más bien representan una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza y su presencia ejerce un enorme impacto en diversos aspectos de la vida humana con múltiples implicaciones tanto sanitarias como tecnológicas. Estas repercusiones son especialmente importantes en el ámbito de la industria alimentaria, donde su control y eliminación puede representar un problema, cuyo abordaje difiere del hasta hoy día aplicado para el de las bacterias en forma libre. En cualquier situación, la eliminación del biofilm es una tarea muy difícil y exigente que puede resultar

sumamente cara y complicada. Para conseguir controlar este problema, cada industria debería involucrarse en la investigación y desarrollar su propia tecnología dependiendo de las variables inherentes a sus procesos.

En síntesis, es un campo nuevo de trabajo que tenemos que empezar a conocer en toda su extensión para valorar sus repercusiones y abordar las soluciones que se plantean.

Palabras clave

Biofilms, industria alimentaria, bacteria, limpieza y desinfección, *quorum sensing*, toxiinfecciones alimentarias.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to biofilms and its impact on Food Safety.

Abstract

In the last two decades, it has been noted that bacteria are found not only free in the environment, as unicellular organisms, but on many occasions may be found forming part of microbial communities with an organization system more typical of colonial organisms, i.e. adhering to surfaces and embedded in extracellular matrices that they synthesize for themselves. These biological structures are known as biofilms.

The formation of biofilms is an adaptive strategy of micro-organisms that allows an increase in their possibilities of surviving in the environment and implies a new concept of "bacteria" as a unicellular organism capable of forming complex structures with inter-relations between individuals that are very close to the behaviour of multi-cellular organisms. The study of these organized microbial populations would be included as a new field of analysis within Microbiology.

The mechanism for the formation of biofilms is very complex, depending on numerous factors inherent to the micro-organism or typical of the surrounding medium. This fact makes it very difficult to generalize in terms of the specific characteristics of these bacterial communities and therefore complicates their understanding. Nonetheless, a consequence of the formation of these structures is that the normal methods for the control and elimination (disinfectants, antibiotics, etc.) of free forms (planktonic) of bacteria are often ineffective against biofilms.

Nowadays, biofilms are known to be not a rarity but rather represent a habitual growth form for bacteria in nature and their presence has an enormous impact on various aspects of human life with multiple health and technological implications. These repercussions are particularly important in the field of the food industry, where their control and elimination may represent a problem with a different approach than that so far applied for free bacteria. In any situation, the elimination of biofilms is a very difficult and demanding task that may turn out to be extremely expensive and complicated. In order to bring this problem under control, each industry must become involved in research and develop its own technology depending on the variables inherent to its own processes.

In summary, it is a new field of work that we have to begin to explore in all its extension in order to assess its repercussions and adopt the proposed solutions.

Key words

Biofilms, Food Industry, bacteria, cleaning and disinfection, *quorum sensing*, foodborne diseases.

Introducción

Los biofilms se definen como comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz orgánica polimérica autoproducida y adherida a una superficie viva (biofilm de mucosa) o inerte y que pueden presentar una única especie microbiana o un abanico de especies diferentes (Carpentier y Cerf, 1993) (Costerton, 1995) (Costerton et al., 1999) (Davey y O'Toole, 2000) (Kraigsley et al., 2002).

En los últimos veinte años, ha ido creciendo la percepción de que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente en una forma unicelular o libre (forma planctónica), como las estudiadas en el laboratorio, sino que la gran mayoría pueden encontrarse formando parte de los biofilms que acabamos de definir (forma sésil) (Donlan, 2002).

Estos dos estados que pueden adoptar las bacterias se diferencian fenotípicamente, siendo necesario incluir este nuevo concepto en la definición de biofilm. Así, un biofilm sería una comunidad microbiana sésil caracterizada por células que están unidas irreversiblemente a un sustrato o interfaz o entre sí, embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares autoproducidas y que exhiben un fenotipo diferente al de esas mismas células en forma planctónica con respecto a la tasa de crecimiento y a la transcripción de genes. Esta definición resulta de gran utilidad, ya que existen algunas poblaciones bacterianas que cumpliendo con los criterios anteriores de un biofilm, que implicaban la existencia de una matriz polimérica extracelular y el crecimiento adherido a una superficie, no asumen realmente el fenotipo biofilm. Estas poblaciones de "no-biofilm", que incluyen las colonias de bacterias que crecen en la superficie del agar, se comportan como células planctónicas "varadas" en una superficie y que no presentan ninguna de las características fenotípicas ni de resistencia inherentes a las biopelículas verdaderas (Donlan y Costerton, 2002).

La percepción creciente de que las bacterias forman estructuras biológicas precisas ha constituido un aliciente a la investigación acerca de las propiedades físicas y químicas de los biofilms, la caracterización de su morfología, y sus formas de desarrollo (Serra, 2003).

La formación de biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en biofilm ofrece cuatro ventajas importantes: (I) protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, (II) incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, (III) facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y (IV) posibilita la transferencia de material genético (ADN). Todas estas circunstancias pueden incrementar sus capacidades de supervivencia. Como consecuencia, los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias del biofilm (Costerton et al., 1999) (Donlan, 2002).

Podemos encontrar biofilms en todos los medios donde existan bacterias: en el medio natural, clínico o industrial. Solo se requiere la presencia de un entorno hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, ya que pueden desarrollarse sobre todo tipo de superficies (hidrofobas o hidrófilas, bióticas o abióticas) (Kraigsley et al., 2002). Desde un punto de vista antropológico, los biofilms nos pueden resultar perjudiciales o beneficiosos. Así pues, existen biofilms sobre las rocas marinas, alrededor de las raíces vegetales y en la piel o la microbiota intestinal. Los podemos encontrar en el interior de las tuberías, en el grifo de la cocina o en el desagüe del refrigerador. También están en la placa dental o contaminando instrumentos implantados como catéteres, prótesis, marcapasos, etc. A nivel tecnológico se emplean para la transformación de productos fermentados, o también en la depuración del agua

residual, por ejemplo, cuando se hace pasar por los filtros de arena donde proliferan selectivamente (Donlan, 2002) (Serra, 2003).

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biofilms en diferentes superficies de conducciones, equipos y materiales y así se pueden observar en industrias lácteas y fábricas de cerveza, en las cubas para el lavado de los granos de cereales, en los tableros de recorte en la industria cárnica, etc. Su presencia puede ser perjudicial e indeseable puesto que en muchos casos producen contaminaciones del producto acabado. Lo que se traduce en una disminución del periodo de conservación o incluso en una transmisión potencial de enfermedades. Desde un punto de vista tecnológico, los biofilms pueden ocasionar reducción del flujo de líquidos, reducción de la transmisión del calor, pérdidas energéticas, bloqueo de los poros de membranas y la corrosión de metales (Serra, 2003) (Fuster i Valls, 2006). Debe señalarse, también, que en el primer eslabón de la cadena alimentaria, en la producción intensiva (avicultura, porcicultura, cunicultura, etc.) la formación de biofilms en las conducciones de agua de bebida es causa de problemas que en ocasiones implican agentes patógenos.

Se realiza a continuación una revisión de las características de los biofilms y de su presencia en la industria alimentaria, así como de las medidas aplicables en la misma, para combatirlos y disminuir el riesgo asociado a su presencia.

Proceso de formación de biofilms

El desarrollo en biofilm es una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. En la actualidad se considera que en condiciones ambientales adecuadas, la mayoría los microorganismos son capaces de formar biofilms (Donlan, 2002) (Lasa et al., 2009).

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos (Sutherland, 2001). En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y diversos productos procedentes de la lisis de las bacterias (Branda et al., 2005).

Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm se puedan encontrar diferentes ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno sea distinta. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad del estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio (Lasa et al., 2009).

1. Fases de la formación de un biofilm

La formación de biofilm es un proceso dinámico y complejo que conlleva el ataque, colonización y crecimiento de microorganismos. No es un proceso aleatorio sino que sigue una sistemática que permite su predicción (Kumar y Anand, 1998). En él podemos identificar hasta cinco fases: una adsorción reversible de la bacteria a la superficie, una unión irreversible, una fase inicial de maduración con crecimiento y división del microorganismo, una etapa posterior de producción del exopolímero y el desarrollo final de la colonia con dispersión de células colonizadoras (Figura 1).

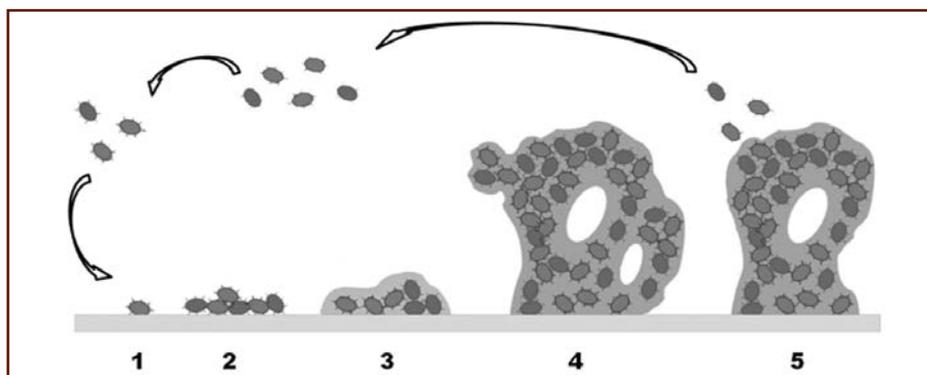


Figura 1. Fases de la formación de un biofilm. **Adaptado de** (Dirckx y Davies, 2003).

A continuación se detallan los procesos incluidos dentro de cada fase del desarrollo de un biofilm.

Fase 1. Absorción

La etapa inicial del proceso de formación del biofilm es la adherencia de una célula sobre una superficie. Este proceso va a depender de factores ambientales, como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que afectan a aspectos como la motilidad, la sensibilidad ambiental y presencia de determinadas proteínas en la superficie de la célula en cuestión (Kumar y Anand, 1998) (Serra, 2003) (Fuster i Valls, 2006).

En bacterias Gram negativas (por ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) se ha visto que la presencia de flagelos, fimbrias de tipo I y IV y *curli* son importantes para la etapa de adherencia primaria. La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram positivas inmóviles como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biofilms. En el caso de las bacterias Gram positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie (por ejemplo: AtlE, Bap, Esp) en esta primera etapa de adherencia (Lasa et al., 2009).

La adhesión de la bacteria a la superficie es un proceso rápido que con frecuencia se produce entre 5 y 30 segundos. Algunos estudios sugieren que para el desarrollo del biofilm debe existir un número mínimo de células adheridas inicialmente a la superficie, lo que a su vez estaría influenciado por la disponibilidad de nutrientes y la temperatura y tiempo de incubación (González, 2005).

Fases 2 y 3. Adhesión a la superficie

La adhesión de la bacteria tiene lugar en dos fases; una primera fase reversible, seguida de una segunda fase irreversible (Kumar y Anand, 1998) (Fuster i Valls, 2006).

La fase reversible consiste en una unión débil de la bacteria con el sustrato mediante fuerzas de *Van der Waals*, electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. En esta fase las bacterias siguen presentando movimiento browniano y pueden ser eliminadas fácilmente con una buena limpieza (González, 2005).

La fase irreversible es dependiente del tiempo y resulta del anclaje a la superficie de los apéndices bacterianos, caso de que existan y/o de la producción por parte de las células bacterianas inicialmente

adheridas de compuestos poliméricos extracelulares. En esta fase las bacterias sintetizan la matriz de exopolisacáridos para establecer un contacto físico entre ellas y la superficie. Una vez se ha establecido, las células bacterianas se multiplican dando lugar a microcolonias y posteriormente al biofilm. Durante el proceso de adhesión, las bacterias cambian su fenotipo y llegan a ser básicamente diferentes respecto a su forma planctónica. Este cambio implica la expresión de genes específicos, se producen cambios y alteraciones en su morfología y cambia su tasa de crecimiento (Donlan y Costerton, 2002) (Chmielewsky y Frank, 2003).

La matriz de exopolisacáridos es uno de los componentes principales que interviene en el mecanismo de adhesión de los microorganismos a las diferentes superficies. Por ello, las estructuras que sobresalen desde la membrana externa como son los lipopolisacáridos, adhesinas y otras proteínas y ácidos lipoteicoicos, pueden desempeñar papeles importantes en la adhesión microbiana. Esto puede ser debido, entre otras causas, a que las sustancias poliméricas extracelulares también se producen en respuesta a la adhesión y al estímulo ambiental, como la presión osmótica, el pH, la temperatura y la falta de nutrientes (Branda et al., 2005) (Fuster i Valls, 2006). La utilidad de la matriz es retener el agua y los nutrientes y proteger a las células del biofilm de los cambios del ambiente y del ataque de predadores, antibióticos y biocidas (Sutherland, 2001) (Donlan, 2002).

Actualmente, la composición de la matriz de exopolímero no está perfectamente definida. Algunos autores han demostrado que contiene polisacáridos o glicoproteínas de distintos azúcares (glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina, etc.). También puede contener proteínas libres, fosfolípidos, ácidos teicoicos y ácidos nucleicos. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria, por ejemplo, alginato en el caso de *P. aeruginosa*, celulosa en *S. enterica* serovar *Typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*, poli-Nacetilglucosamina en *S. aureus*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biofilm. Así, algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir además de alginato un polisacárido rico en glucosa que forma una película en la interfase medio aire al que se ha denominado "Pellican" (Sutherland, 2001) (Branda et al., 2005) (Lasa et al., 2009).

En un biofilm maduro, la mayor parte de su volumen está ocupado por una matriz laxa (75-95%) alrededor de unas pocas bacterias (5-25%), que proporcionan una cubierta gelatinosa y deslizante a la superficie colonizada, con un considerable volumen de agua disponible (Chmielewsky y Frank, 2003).

Para la unión irreversible entre la célula y la superficie es necesario un tiempo de contacto mínimo. Este periodo es usualmente corto y varía en función de la disponibilidad de nutrientes, temperatura y presencia de antibióticos. En este sentido, varios estudios indican que las uniones irreversibles necesitan para formarse entre 20 minutos y cuatro horas a una temperatura de entre 4 y 20 °C (Fuster i Valls, 2006).

Fase 4. Crecimiento y maduración

Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células bacterianas hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como sucede durante el proceso de formación de colonias en las placas de medios con agar (Kumar y Anand, 1998) (Lasa et al., 2009).

Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente del biofilm se desarrollará una estructura organizada. A este proceso se le denomina maduración. Un biofilm maduro puede consistir en una simple capa de bacterias, en un polímero extracelular poroso o en múltiples capas de microcolonias sueltas o embebidas por las sustancias poliméricas extracelulares.

Este desarrollo y maduración del biofilm depende de factores como la disponibilidad de nutrientes, la diversidad microbiana de la comunidad, la disponibilidad de agua y el transporte celular (Chmielewsky y Frank, 2003).

A medida que madura el biofilm, se va adaptando a la presencia de nutrientes, al oxígeno y a los cambios poblacionales, formando microcolonias discretas separadas por canales de agua. La densidad estructural de la matriz se incrementa en el núcleo mientras que las capas superiores permanecen porosas. Las bacterias con un metabolismo más activo permanecen en la superficie de las capas de la matriz, cerca de los canales de agua. Los canales de agua permiten la dispersión y el intercambio de sustancias orgánicas, cationes metálicos y metabolitos. Los nutrientes se atrapan y concentran en la matriz del biofilm y se mueven por ésta por difusión. El número de bacterias viables se reduce con la edad del biofilm; así en un biofilm joven se han detectado cerca de un 80% de células bacterianas viables, y tan solo un 50% en un biofilm maduro (Branda et al., 2005) (Fuster i Valls, 2006).

Fase 5. Dispersión de células colonizadoras

Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso (Donlan, 2002) (Lasa et al., 2009).

La liberación de las bacterias desde el biofilm es la parte del proceso que menos se conoce. Se puede deber a modificaciones internas en la estructura del biofilm o producirse por actuación de fuerzas físicas (Donlan, 2002) (Lasa et al., 2009).

En el caso de *Staphylococcus aureus* se ha descrito un proceso de variación de fase producido por la inserción reversible de un elemento de inserción (IS256) en el interior del operón responsable de la síntesis del exopolisacárido del biofilm (icaADBC). El proceso de inserción del elemento parece ocurrir aleatoriamente en la población con una frecuencia de una por cada 10^6 bacterias y produce microorganismos deficientes en la capacidad de síntesis del exopolisacárido y por tanto deficientes en la formación del biofilm. Esto permite a la bacteria mantener un pequeño porcentaje de la población incapaz de sintetizar el exopolisacárido y capaz, por lo tanto, de poder escapar del biofilm. Como la inserción es un proceso reversible, el salto del elemento de inserción desde el operón provocará una nueva variación de fase. Otra alternativa descrita en *S. aureus* consiste en la obtención de variantes deficientes en la formación del biofilm debido a la eliminación de una isla de patogenicidad que contiene elementos esenciales para el proceso de formación del biofilm. En *Actinobacillus actinomycetemcomitans* se ha descrito una actividad enzimática, que degrada de forma específica el exopolisacárido de la matriz del biofilm. La presencia en distintos proteomas de hipotéticas proteínas (endoglucanasas), que podrían ser responsables de una función similar, sugiere que la degradación controlada del exopolisacárido puede representar un mecanismo controlado de liberación de bacterias del biofilm (Lasa et al., 2009).

El desprendimiento de bacterias del biofilm provocado por la acción de fuerzas físicas ha sido estudiado con mayor detalle. Los tres principales procesos que permiten la liberación celular son la erosión

(eliminación continua de pequeñas porciones del biofilm), la muda (liberación rápida y masiva) y la abrasión (desprendimiento debido a la colisión de partículas de líquido contra el biofilm). Se ha observado que la tasa de erosión se incrementa al aumentar el espesor del biofilm y la fricción en la interfaz líquido biofilm. La muda, sin embargo, resulta ser un proceso más aleatorio que la erosión y se cree que resulta del agotamiento de los nutrientes u oxígeno dentro de la estructura de biofilm. Este proceso se observa más frecuentemente en los biofilms más gruesos que se han desarrollado en ambientes ricos en nutrientes. Los biofilms formados en tuberías, filtros y entornos cargados de partículas (aguas superficiales) suelen estar sujetos a la dispersión por abrasión (Donlan, 2002).

La liberación de bacterias desde el biofilm también se ha demostrado que es un proceso especie específico; *P. fluorescens* se dispersa y recoloniza una superficie después de aproximadamente 5 h, *V. parahaemolyticus* después de 4 h y *V. harveyi* después de sólo 2 h. Este proceso probablemente proporciona un mecanismo de migración bacteriana desde áreas fuertemente colonizadas que han sido agotadas de nutrientes a áreas más favorables para el crecimiento (Donlan, 2002).

El modo de dispersión influye, aparentemente, en las características fenotípicas de los microorganismos. Los agregados erosionados desde el biofilm por fuerzas físicas mantienen ciertas características del fenotipo biofilm, como las propiedades de resistencia antimicrobiana, mientras que las bacterias que han sido dispersadas como resultado del crecimiento normal del biofilm pueden revertir rápidamente al fenotipo planctónico (Donlan, 2002).

2. Regulación del proceso de formación del biofilm

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está regulado por una compleja cascada de reguladores. Estudios realizados con *P. aeruginosa* han demostrado que la formación del biofilm está regulada por un proceso de *quorum sensing* o autoinducción. El sistema de *quorum sensing* es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, autoinductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de la población existente. En bacterias Gram negativas el principal autoinductor es la acil-homoserina lactona, mientras que en bacterias Gram positivas los autoinductores suelen ser de naturaleza peptídica. Cuando en el medio extracelular se acumula una suficiente cantidad del autoinductor, éste activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos (Donlan, 2002) (Lasa et al., 2009).

En relación con el *quorum sensing*, se ha identificado una molécula denominada "Furanona" producida por el alga *Delisea pulcra*, con una estructura similar a las acil-homoserina lactonas. Estas moléculas se unen a los mismos receptores, pero en lugar de activarlos, los bloquean, inhibiendo la consiguiente formación de biofilm (Lasa et al., 2009). En la actualidad se está intentando desarrollar inhibidores de la formación del biofilm basados en derivados de la furanona, ya que esta molécula es extremadamente tóxica. De forma similar en *S. aureus* se ha descrito un péptido denominado RIP, que interactúa con el sistema de *quorum sensing* inhibiendo el proceso de formación del biofilm (Lasa et al., 2009).

Además del *quorum sensing*, otros reguladores globales como CsrA en *E. coli* y CytR en *V. cholerae*, son determinantes importantes para el desarrollo del biofilm de estas bacterias (Donlan, 2002). En *S. aureus* se ha demostrado que un regulador global de virulencia denominado SarA es esencial para el desarrollo del biofilm. Así, existen reguladores de virulencia que son a su vez reguladores de la formación del biofilm, sirviendo de conexión entre ambos procesos (Lasa et al., 2009).

Además de la regulación a nivel transcripcional, existen numerosos indicios de la existencia de una regulación postranscripcional del proceso de formación del biofilm.

En el caso de *S. e. serovar Typhimurium*, por ejemplo, la activación de la síntesis de celulosa se produce por el activador alostérico c diGMP cuya concentración depende de dos actividades enzimáticas, diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa, asociadas a enzimas que contienen los dominios GGDEF y EAL. En *S. e. serovar Typhimurium* existen al menos 21 proteínas que contienen estos dominios, y se desconoce si todas ellas afectan a la regulación del proceso de síntesis de celulosa en distintas condiciones ambientales o si son responsables de otras funciones. En *V. cholerae*, *Yersinia pestis*, *P. fluorescens* y *Gluconacetobacter xylinum*, también se han descrito proteínas con dominio GGDEF implicadas en la formación del biofilm, indicando que esta molécula es un transmisor secundario de señal común al proceso de regulación de la producción de exopolisacáridos en las bacterias (Lasa et al., 2009).

Finalmente, parece lógico que la formación de biofilm se produzca en respuesta a las condiciones ambientales y por tanto que existan sistemas de fosfotransferencia de dos-componentes que transmitan la señal ambiental al interior de la bacteria para adecuar la expresión de genes a la nueva situación ambiental (Lasa et al., 2009).

Factores que influyen en el desarrollo del biofilm

Existen varios factores que afectan al desarrollo del biofilm como son (González, 2005) (Fuster i Valls, 2006):

- Las propiedades de las superficies de contacto.
- El tiempo de contacto.
- Las características de la superficie bacteriana.
- La disponibilidad de nutrientes.
- La composición de la comunidad microbiana.
- La disponibilidad de agua.

En la siguiente tabla (Tabla 1) se muestran alguna de las variables más importantes que intervienen en el proceso de adherencia y crecimiento de los biofilms.

Tabla 1. Adherencia y crecimiento de los biofilms. Variables más importantes		
Propiedades de la superficie	Propiedades del fluido	Propiedades de la bacteria
Textura	Velocidad del flujo	Hidrofobicidad de la superficie celular
Hidrofobicidad	pH	Fimbrias
Material	Temperatura	Flagelos
	Cationes	Sustancias extracelulares poliméricas
	Presencia de agentes antimicrobianos	

Fuente: (Donlan, 2002).

1. Propiedades de las superficies de contacto

El tipo de sustrato influye en las características de la unión. Las bacterias tienden a unirse a las superficies hidrófilas uniformemente en una capa, mientras que en el caso de las superficies hidrófobas tienden a unirse en grupos (Fuster i Valls, 2006).

En algunos trabajos ha demostrado que las bacterias quedan retenidas en las imperfecciones de las superficies; además, las superficies rugosas son más difíciles de limpiar y acumulan suciedad permitiendo que las bacterias vuelvan a multiplicarse (González, 2005).

El acero inoxidable se usa frecuentemente como material para la cocina y en las instalaciones industriales porque es resistente a los golpes, a la corrosión, dura mucho tiempo y es de sencilla fabricación, además de ser estable, inerte y de fácil limpieza. A escala microscópica se observa, sin embargo, que el acero presenta diminutas oquedades que permiten una mayor retención de bacterias por el incremento del número de puntos de adhesión. Boyd et al. (2001) demostraron que los niveles de higiene en las superficies de contacto podían verse disminuidos con el uso y provocar que la superficie se deteriorase. Los defectos de las superficies pueden actuar como puntos de retención de microorganismos y materia orgánica. Las superficies rugosas acumulan suciedad y son de más difícil limpieza que las lisas. En consecuencia, los defectos de las superficies proporcionan protección a la suciedad y los microorganismos, lo que hace que las bacterias supervivientes puedan volver a multiplicarse y formar un biofilm (Fuster i Valls, 2006).

Estudios realizados en botellas de agua mineral muestran que las superficies lisas de las botellas de PET (tereftalato de polietileno) apenas eran colonizadas por bacilos mientras que las superficies más rugosas e hidrofílicas del HPDE (polietileno de alta densidad) de los tapones eran pobladas por grupos de cocos (Chmielewsky y Frank, 2003).

Con respecto a las propiedades del líquido que fluye sobre la superficie en la que se va a formar el biofilm, cabe destacar que, sorprendentemente, las bacterias forman biopelículas preferentemente en entornos de alta turbulencia. Las células planctónicas pueden adherirse a superficies e iniciar la formación de biofilms en presencia de fuerzas de cizalladura que superan un número de *Reynolds*¹ de 5.000. Existen numerosas especulaciones sobre el porqué de este hecho, pero cualquiera que sea el mecanismo, se ha demostrado que los biofilms se forman preferentemente en localizaciones de alta turbulencia en sistemas naturales e industriales. Los estudios de adherencia bacteriana han demostrado que los biofilms formados en entornos de baja turbulencia, tienen una baja resistencia a la tracción y se rompen con facilidad, mientras que aquellos formados en entornos de flujo turbulento son más fuertes y resistentes a la rotura mecánica (Donlan y Costerton, 2002).

2. Tiempo de contacto

Un mayor tiempo en contacto (exposición) entre las células y el sustrato permite que se establezca un mayor número de uniones haciendo la adhesión irreversible, y por tanto, factores, como las condiciones ambientales, tipo de microorganismo, sustrato y presión en el caso de superficies de trabajo o utensilios, pueden también influir de manera importante en la mayor posibilidad de formación de biofilm (Pérez-Rodríguez et al., 2008).

3. Características de la superficie celular

Las características de la superficie celular como los flagelos, pili, proteínas de adhesión y cápsulas ejercen también su influencia. Los pili actúan como un velcro para anclar las bacterias a algunas

¹El número de *Reynolds* es un número adimensional que describe el flujo turbulento de un líquido, si este número es alto, existe un flujo turbulento, si es bajo, prevalecen las condiciones de un flujo laminar.

superficies y también actúan como quimiorreceptores, dirigiendo a la bacteria hacia a algunos sitios específicos. La pérdida de estos apéndices cambia las propiedades de superficie de la bacteria, lo que puede provocar una menor capacidad de adhesión. También se conoce que los esporos se adhieren mejor a la superficie que las células vegetativas debido al grado de hidrofobicidad de su superficie (González, 2005).

4. Disponibilidad de nutrientes

La disponibilidad de nutrientes ejerce una influencia mayor sobre la estructura y composición de biofilm. Estudios realizados sobre biofilms de *Listeria* spp. han puesto de manifiesto que niveles bajos de fosfatos estimulan el desarrollo de biofilms, aunque el efecto se reducía después de varios días (Chmielewsky y Frank, 2003). Asimismo su desarrollo depende también del tipo de azúcar utilizado, siendo la trehalosa y manosa las que proporcionan un nivel más pobre de formación de biofilm.

5. Composición y diversidad microbiana

Los biofilms multiespecies son más gruesos y estables frente al estrés ambiental que los monoespecies. En una superficie, el grosor medio de los biofilms de *Klebsiella pneumoniae* y *P. aeruginosa* monoespecie son de 15 y 30 μm respectivamente, mientras que un biofilm formado por ambas especies bacterianas presenta un grosor de 40 μm (Kumar y Anand, 1998). Esto se atribuye a la secreción combinada de las distintas sustancias poliméricas extracelulares resultantes de los diferentes microorganismos (Chmielewsky y Frank, 2003).

La implicación de la diversidad microbiana en los biofilms relacionados con la industria alimentaria no se ha determinado, ya que la mayoría de los estudios están focalizados hacia biofilms en aguas y sistemas de agua residuales. En una planta de procesamiento existen lugares como los desagües del suelo que son proclives a la formación de biofilms multiespecie debido a su alta diversidad bacteriana y otras, como una placa de calor, propicias a la formación de biofilms monoespecies (Chmielewsky y Frank, 2003).

Se ha observado la asociación de varias especies patógenas, incluyendo *Legionella pneumophila*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *E. coli* O157:H7, *S. e. serovar Typhimurium*, *V. cholerae* y *Helicobacter pylori*, en la formación de biofilms multiespecie. A pesar de que todas ellas son capaces de adherirse a una superficie y comenzar el crecimiento, la mayoría no tiene capacidad por si sola de completar el desarrollo del biofilm. Cada vez se tiene más la percepción de que los biofilms son comunidades biológicas heterogéneas que se adaptan a la evolución de las condiciones ambientales y a la composición de la Comunidad (Donlan, 2002).

6. Disponibilidad de agua

La disponibilidad de agua es un factor crucial para la viabilidad del biofilm. Una humedad relativa en torno al 90-100% posibilita el desarrollo del biofilm, por ello la mayoría de los biofilms se encuentran en ambientes acuosos como pueden ser los sistemas de conducción o tuberías de las industrias lácteas (Pérez Rodríguez et al., 2008). Sin embargo, también se ha encontrado que valores en torno al 70-80% pueden ser suficientes para permitir el desarrollo del biofilm (Keskinen et al., 2008) indicando que ambientes con humedad relativa alta (por ejemplo: aerosoles) pueden incrementar significativamente el riesgo de su aparición. La temperatura

es un factor también determinante y a la vez, relacionado con la humedad relativa, ya que se ha observado que valores en el rango 20-30 °C incrementan la probabilidad de formación del biofilm, mientras que valores por encima de este rango inciden negativamente sobre ese proceso (Else et al., 2003).

Formación de biofilms por patógenos alimentarios

A pesar de que la mayoría de las especies bacterianas tienen la capacidad de formar biofilms, algunos géneros lo forman más fácil y rápidamente que otros, como es el caso de *Pseudomonas*, *Listeria*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* y *Bacillus* (Mattila-Sandholm y Wirtanen, 1992) (Lee Wong, 1998).

En un ambiente de procesado de alimentos, la microbiota existente probablemente esté formada por una mezcla de muchas especies (Bagge-Ravn et al., 2003). Sin embargo, no se ha podido demostrar hasta la fecha si la presencia de unas especies u otras es fruto de un fenómeno de selección natural.

El conocimiento de esta microbiota, residente en las instalaciones y en el ambiente de una planta de procesado de alimentos, sería una información de gran utilidad para el diseño de los programas de limpieza y desinfección. En contraposición a los alimentos, en los que se ha investigado mucho sobre su ecología microbiana a lo largo de los últimos años, existe un vacío de información respecto a las superficies que contactan con dichos alimentos puesto que los esfuerzos se han centrado más en observar el comportamiento de patógenos específicos como *L. monocytogenes* o bacterias alterantes como *Pseudomonas* spp. En estos estudios se pudo constatar que la contaminación del producto puede ser originada directamente a partir del equipo de procesado. Algunos microorganismos como *L. monocytogenes* pueden persistir durante varios años en las superficies de estos equipos (Fuster i Valls, 2006).

Si bien son numerosas las especies susceptibles de formar biofilms en la industria de producción de alimentos se citan a continuación algunas de especial importancia en relación con la seguridad alimentaria (González, 2005).

1. *Listeria monocytogenes*

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos Gram positivos cortos, regulares, no esporulados, móviles, anaerobios facultativos, catalasa positivos y oxidasa negativos. Las especies de *Listeria* están muy extendidas en el medio ambiente; se han aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, queso, leche no procesada, desechos de matadero, así como en el tracto digestivo de humanos y animales. *L. monocytogenes* se ha aislado de numerosas especies de mamíferos, aves, peces, crustáceos e insectos, aunque su principal hábitat es el suelo y la materia vegetal en descomposición, en la cual sobrevive y crece como saprofito. Debido a su amplia distribución, estos microorganismos poseen muchas oportunidades de contaminar alimentos en distintas etapas de la producción alimentaria, siendo ésta la vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección (Oteo y Alós, 2009).

L. monocytogenes es un patógeno con capacidad de proliferación en entornos fríos y húmedos, ideales para la formación de biofilms, tanto mono como multiespecíficos (Chmielewsky y Frank, 2003). Aunque también se ha observado una importante variación en la capacidad de formación de biofilm entre la distintas cepas de *L. monocytogenes* (Borucki et al., 2003). Esta bacteria está presente en el entorno doméstico y se puede encontrar también fuera de la cocina, particularmente en áreas húmedas.

Las cepas de *Listeria* presentan gran facilidad para adherirse a superficies vivas e inertes y requieren solo un corto espacio de tiempo para la unión. Para iniciar la adhesión, utiliza flagelos, pilis y proteínas de membrana. Se ha observado que *Listeria* muestra mayor adhesión cuando está en la fase de mayor actividad metabólica (González, 2005).

Estudios sobre este patógeno han demostrado que puede llegar a formar biofilm en maquinas loncheadoras y en otros utensilios de acero. Keskinen et al. (2008) encontraron que *L. monocytogenes* fue capaz de formar biofilm en el acero de cuchillos cuando estos fueron incubados 6-24 h a una humedad relativa aproximada del 78%. Es más, estos mismos autores indicaron que la transferencia durante fenómenos de contaminación cruzada se ve incrementada en aquellas cepas con mayor capacidad de formación de biofilm. Este hecho pone de relevancia los biofilm como un factor de importancia en la contaminación cruzada.

En la industria láctea, *Listeria* puede encontrarse presente tanto en la leche líquida como en los productos elaborados, pudiendo estar asociada a la aparición de brotes clínicos. Estudios realizados en este tipo de industria demuestran que la presencia de restos de proteínas lácteas en las conducciones reduce la adhesión bacteriana, poseyendo, según los autores, una posible capacidad inhibitoria de la formación del biofilm es sus primeras etapas. Sin embargo, una vez instaurado éste, la presencia de residuos lácteos en las conducciones favorece la supervivencia del biofilm ya que supone una fuente de nutrientes para las bacterias (Lee Wong, 1998).

2. *Salmonella* spp.

Al igual que el resto de las enterobacterias, este género está formado por bacilos cortos Gram negativos, no esporulados, anaerobios facultativos y móviles en su mayoría. Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas por la naturaleza, son bastante resistentes a las condiciones ambientales y muy poco exigentes en sus requisitos nutricionales lo que les permite un rápido crecimiento y capacidad de colonización de ambientes muy diversos, entre ellos el agua y los alimentos (Todar, 2008).

Entre las zoonosis de etiología bacteriana más importantes, la salmonelosis ocupa un lugar destacado, debido tanto a sus múltiples formas clínicas como a las repercusiones que en materia de Salud Pública tiene la aparición de brotes de esta enfermedad. Según datos de la *European Food Safety Authority* (EFSA), *Salmonella* spp. es el primer causante de brotes de toxoinfección alimentaria en la Unión Europea (UE) en los últimos años (EFSA, 2009).

Varios estudios han demostrado que *Salmonella* se puede adherir y formar biofilms en superficies que se encuentran en las plantas de procesamiento de alimentos y entre las que se incluyen plástico, cemento y acero (Joseph et al., 2001) (Chmielewsky y Frank, 2003). Esto se debe a que posee estructuras de superficie, como la SEF-17 *fimbriae*, que le facilitan la adhesión a las superficies inanimadas, dando a las células una capacidad de resistencia frente a fuerzas mecánicas (González, 2005).

Diversos estudios han demostrado que *Salmonella*, *E. coli* y muchas otras enterobacterias producen celulosa como exopolisacárido principal de la matriz del biofilm y que la formación de éste resulta esencial para la supervivencia de la bacteria en el ambiente (Lasa et al., 2009).

En un estudio de hogares en los que se habían producido casos de toxoinfecciones por *Salmonella*, este microorganismo fue aislado del 6% de los trapos y bayetas del hogar lo que sugiere la posibilidad que el organismo pueda crecer y sobrevivir en los trapos de cocina (González, 2005).

Estudios realizados en la industria de harinas de pescado demostraron que existen diferencias entre los distintos serotipos de *Salmonella enterica* en la facilidad de producir biofilms y en la perdurabilidad de los mismos; los serotipos que mostraron mayor capacidad de formación de biofilms fueron Agona y Montevideo (Vestby et al., 2009).

3. *Escherichia coli*

Este género bacteriano está formado por bacilos Gram negativos, catalasa positivos y oxidasa negativos, no formadores de esporos, anaerobios facultativos con un amplio rango de incubación, inmóviles o móviles mediante flagelos peritricos y con necesidades nutricionales sencillas (Todar, 2008).

Escherichia coli, agente etiológico de la colibacilosis, es la especie bacteriana predominante de la microbiota normal del aparato digestivo de la mayor parte de los animales y del hombre. Es la especie tipo del género *Escherichia* y se elimina al exterior a través de las heces (Todar, 2008) (CDC, 2008).

Algunos tipos de *E. coli* son capaces de producir una toxina similar a la producida por el género *Shigella*, denominándose a este grupo *E. coli* productores de toxina Shiga o STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*). Uno de los serotipos más frecuentemente aislados de toxii infecciones alimentarias y que pertenecen a este grupo es el *E. coli* O157:H7 (CDC, 2008).

La colibacilosis por el serotipo O157:H7 se trata de una de las zoonosis alimentarias más frecuentes e importantes en el hombre debido a la gravedad de los cuadros clínicos y al número de afectados, sobre todo por el consumo de carne de vacuno pudiendo suponer un grave riesgo para la salud pública. En el hombre, la colibacilosis entérica se produce por la penetración de *E. coli* a través de los alimentos permaneciendo en el epitelio intestinal causando, en general, cuadros de diarrea que en casos más graves pueden evolucionar a disentería, colitis hemorrágica, el síndrome urémico/hemolítico e incluso a púrpura trombocitopénica. En el caso de la colibacilosis extraintestinal se dan cuadros de infecciones urinarias, meningitis neonatales, septicemias, peritonitis, mastitis, neumonía, etc. (CDC, 2008).

Para la formación de biofilms, *E. coli* emplea flagelos, pilis y proteínas de membrana para iniciar la adhesión. Cuando ya está unida a la superficie pierde sus flagelos e incrementa la producción de sustancias poliméricas extracelulares (González, 2005) (Houdt y Michiels, 2005). Estudios han encontrado que algunas cepas de *E. coli* O157:H7 pueden desarrollar biofilms como resultado de una mayor producción de exo-polisacáridos y *Curli* (Ryu et al., 2004). Además, se ha demostrado que la formación de biofilm proporciona una mayor resistencia a *E. coli* O157:H7 cuando se expone a soluciones de hipoclorito, uno de los desinfectantes de mayor uso en la industria alimentaria (Ryu y Beuchat, 2005).

En la siguiente tabla (Tabla 2) se muestran los determinantes de superficie implicados en las diferentes fases de formación del biofilm.

Tabla 2. Determinantes de superficie de *E. coli* implicados en la formación del biofilm

Fase de formación del biofilm	Determinantes de superficie
1. Acondicionamiento y adhesión reversible	Flagelos y movilidad
2. Adhesión irreversible	Fimbrias tipo I
	<i>Curli</i>
	Sustancias poliméricas extracelulares
3. Etapa inicial de crecimiento del biofilm	Motilidad
	<i>Curli</i>
	Antígeno 43 (proteína autotransportadora)
	Sustancias poliméricas extracelulares
4. Maduración	Sustancias poliméricas extracelulares
	<i>Curli</i>
	Pili conjugativo
5. Dispersión	Flagelos y movilidad

Fuente: (Houdt y Michiels, 2005).

4. *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positivos, aeróbicos estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. Las *pseudomonas* son microorganismos alterantes ubicuos (Todar, 2008). Se encuentran en ambientes de procesado de alimentos incluidos desagües, suelos, verduras, superficie de las carnes y en ácidos débiles de uso común (Chmielewsky y Frank, 2003) (González, 2005).

Pseudomonas aeruginosa se considera como un patógeno nosocomial primario. Según datos del Center for Disease Control and Prevention (CDC), la incidencia media de *P. aeruginosa* en los hospitales de Estados Unidos es del 0,4% y este patógeno es el cuarto más comúnmente aislado de infecciones nosocomiales (Todar, 2008).

P. aeruginosa es el modelo bacteriano en el que se han realizado la mayoría de los estudios de formación de biofilms y regulación mediante *quorum sensing* (Golovlev, 2002). Produce gran cantidad de sustancias poliméricas extracelulares pudiéndose unir a superficies de materiales inorgánicos, como el acero inoxidable. Se comporta igual que *E. coli* perdiendo sus flagelos cuando ya está unida a la superficie e incrementando la producción de sustancias poliméricas extracelulares. Dentro del biofilm puede coexistir con *Listeria*, *Salmonella* y otros patógenos formando biofilms multiespecíficos mucho más estables y resistentes (Chmielewsky y Frank, 2003) (González, 2005).

5. *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni es una bacteria Gram negativa con forma de bastón, delgada, curva y móvil. Es un organismo microaerófilo, lo cual significa que necesita de niveles reducidos de oxígeno para sobrevivir. Es relativamente frágil y sensible a los diferentes tipos de estrés del medio ambiente (Todar, 2008).

Si observamos la clasificación emitida por la OMS (WHO, 2000), cita la campilobacteriosis como la toxiinfección alimentaria que causa la mayoría de los problemas en prácticamente todo el mundo, seguida de la salmonelosis y el cólera. Según datos de la EFSA (2009), *Campylobacter* es el primer causante de casos de toxiinfección alimentaria en la UE en los últimos años.

Aunque *Campylobacter* no se multiplica en alimentos, su dosis infectiva mínima es muy pequeña, es menor que cualquier otro patógeno. Además, la investigación experimental ha sugerido que *Campylobacter* puede tener un mayor potencial de diseminación durante la manipulación de alimentos por parte del consumidor que otros patógenos lo que incrementa el riesgo de contaminación cruzada (Joshua et al., 2006) (Hanning y Slavik, 2009).

Uno de los mecanismos de supervivencia de *Campylobacter* spp. en el medio ambiente es la formación de biofilms. Se ha visto que *Campylobacter* es capaz de producir estas biopelículas tanto en ambientes acuáticos como sobre superficies de acero inoxidable y de cristal. El microambiente creado en el interior del biofilm, protege a *C. jejuni* de su inactivación por la presencia de oxígeno. Se ha demostrado que esta bacteria en el interior del biofilm es capaz de sobrevivir durante una semana a 10 °C, con escasos niveles nutritivos y en condiciones atmosféricas normales, a pesar de su sensibilidad a este tipo de ambientes. También se ha observado que *C. jejuni* desarrolla biofilms más rápidamente bajo las condiciones aeróbicas más estresantes (20% O₂) que en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂), lo que muestra la capacidad de este microorganismo de adaptar las condiciones propias del biofilm en su beneficio, actuando como reservorio de células viables (Reuter et al., 2010). Estos estudios ponen de manifiesto el papel que la formación de biofilms supone para mantener la presencia activa de *Campylobacter* en los ambientes de procesado de alimentos, aumentando el riesgo de contaminación (Murphy et al., 2006).

6. *Bacillus* spp.

Bacillus cereus es un microorganismo Gram positivo, con forma de bastón alargado, aerobio facultativo y formador de esporos (Todar, 2008).

Bacillus spp. es capaz de sobrevivir durante aquellos procesos que utilizan calor y acumularse en las tuberías y en las juntas de estos entornos de procesado de alimentos. Incluso si los fluidos calientes fluyen continuamente sobre estas superficies durante más de 16 horas, *Bacillus* y otras bacterias termorresistentes son capaces de formar biofilms (Chmielewsky y Frank, 2003) (González, 2005).

7. *Staphylococcus aureus*

Las bacterias del género *Staphylococcus* son microorganismos ubicuos difíciles de eliminar que colonizan ambientes muy dispares formando parte de la microbiota habitual de la piel, la garganta y las fosas nasales de sus hospedadores vertebrados. *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo aerobio o anaerobio facultativo que produce fermentación láctica y es catalasa y coagulasa positivo. Posee numerosos factores de virulencia, en su mayoría componentes de la pared celular, y una variedad de exoproteínas que facilitan la colonización de nuevos hábitats. Estas propiedades, hacen que los estafilococos sean la causa de numerosas infecciones en mamíferos, que van desde afecciones superficiales de la piel a patologías severas como neumonías, meningitis, intoxicaciones alimentarias, shock séptico y desórdenes autoinmunes (Todar, 2008).

Es un importante patógeno alimentario, y la intoxicación estafilocócica es una de las causas más prevalentes de gastroenteritis en el mundo. Según datos de la EFSA, *S. aureus* fue el causante del 4,1% de los brotes de infecciones alimentarias acaecidos en 2006 en la UE (EFSA, 2007).

Esta bacteria se puede encontrar en alimentos crudos, equipos o manipuladores y puede pasar a otros alimentos por contaminación cruzada, si bien necesita multiplicarse hasta alcanzar concentracio-

nes de 10^5 ufc/g para producir la toxina y provocar la enfermedad. Los tiempos de supervivencia de *S. aureus* se ven incrementados con bajas temperaturas, altos pH y bajos niveles de aniones de lactato o de nitrato (González, 2005).

Biofilms en la industria alimentaria

Los biofilms pueden formarse en todo tipo de superficies en la industria alimentaria, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos (Chmielewsky y Frank, 2003).

Puesto que pueden contener microorganismos patógenos y presentar una mayor resistencia a la desinfección, incrementan las probabilidades de contaminación del producto y de provocar infecciones alimentarias, razón por la que se considera que la presencia de biofilms en las superficies de contacto de la industria alimentaria constituye un evidente riesgo para la salud.

Uno de los principales problemas en la industria alimentaria está representado por la supervivencia de microorganismos patógenos o alterantes debido a una desinfección insuficiente de las superficies o de los instrumentos en contacto con los alimentos. En general, aquellos procesos que causen la dispersión en aerosol de los microorganismos sobre las superficies o el producto acabado, deben centrar los esfuerzos en la ejecución de los programas de prevención (Carpentier y Cerf, 1993) (Fuster i Valls, 2006).

Los biofilms formados en las superficies que están en contacto con los alimentos son la causa principal de contaminación del producto final. Las consecuencias de esta contaminación pueden conducir a pérdidas económicas dado el necesario rechazo del producto o incluso, a enfermedades si intervienen patógenos (Serra, 2003).

Por este motivo es preciso eliminar todos los microorganismos de las superficies en contacto con los alimentos, antes de que los contaminen y establezcan un biofilm que servirá de reservorio. El biofilm formado sobre las carnes crudas y en el entorno del proceso del manipulador (superficies, utillaje e instrumentos...) aumenta considerablemente los problemas de contaminación cruzada y de contaminaciones posteriores en el procesado (Serra, 2003) (Fuster i Valls, 2006).

En el caso de la carne, se ha detectado la presencia y unión de distintos microorganismos a las superficies cárnicas, especialmente en el pollo, sin embargo no está claro que la formación del biofilm se pueda ver favorecida por estas superficies sino más bien parece que los microorganismos estudiados están más relacionados con la contaminación cruzada que con el sacrificio (Carpentier y Cerf, 1993) (Serra, 2003).

Afortunadamente, en la industria alimentaria la formación de biofilms puede mantenerse controlada con programas correctos de limpieza y desinfección que se apliquen frecuentemente y de forma adecuada (Serra, 2003).

Además del riesgo de contaminación, el desarrollo de biofilms puede interferir en diferentes procesos y causar daños en los equipos. En sistemas de agua potable la formación de biofilms pueden obstruir las cañerías disminuyendo su velocidad y su capacidad de transporte originando un incremento en el consumo energético. En el sector primario, en las naves ganaderas de producción intensiva, los biofilms que se forman en las conducciones de agua y en las redes de residuales, representan un problema que agrava la dificultad para la desinfección de los circuitos, haciendo necesario recurrir a tratamientos drásticos para eliminarlos con agua caliente a presión o vapor fluyente. La formación de biofilm en intercambiadores de calor y torres de refrigeración puede reducir la transferencia de calor y

como consecuencia su eficiencia en el proceso. La formación de biofilms persistentes en las superficies metálicas puede causar corrosión debido a la producción de ácido por parte de las bacterias. Para la prevención de los riesgos y del coste de los daños que causan los biofilms son necesarios procedimientos de limpieza y desinfección efectivos (Silagyi, 2007).

La formación de biofilms en las conducciones de agua potable ha sido ampliamente estudiada y se ha descrito cómo esta presencia reduce la velocidad y la capacidad de circulación y colmata las tuberías, lo que conduce a un mayor consumo de energía para obtener un rendimiento menor (Chmielewsky y Frank, 2003). Además, la formación de biofilms puede bloquear el flujo, la impedancia de la transmisión térmica y favorecer la corrosión de superficies metálicas, problemas que son frecuentes en las industrias alimentarias (Serra, 2003).

En la industria láctea y en otras industrias alimentarias, se emplean los sistemas de ultrafiltración y de osmosis inversa durante el fraccionamiento de la leche y otros líquidos así como para la clarificación de zumos de frutas. Estos filtros y membranas tienen unos poros de muy pequeño diámetro y están continuamente en contacto con el alimento; la más mínima adsorción microbiana bloquearía los poros y provocaría la colmatación del filtro. Esto produciría una reducción del flujo con las consiguientes pérdidas de rendimiento y de producto (Serra, 2003).

Medidas aplicables en la industria encaminadas a minimizar el riesgo. Recomendaciones

Los principales objetivos del control microbiano y de la eliminación de biofilms en la industria alimentaria son prevenir el deterioro de los productos y asegurar que se cumplen las especificaciones de calidad y seguridad de los mismos.

Por todo ello no es de extrañar el afán incesante de la mayoría de industrias químicas para lograr sacar al mercado el desinfectante ideal que asegure la eliminación de los biofilms, concretamente la matriz de exopolímeros que embebe a los microorganismos (Fuster i Valls, 2006).

Los resultados de diversos estudios han demostrado que las bacterias fijadas a las superficies muestran resistencia mayor a los agentes antimicrobianos y a los efectos de condiciones medioambientales adversas. El hipoclorito sódico, por ejemplo, es incapaz de penetrar completamente en un biofilm mixto de *Pseudomona-Klebsiella* (400 μm de espesor) después de una hora de exposición.

A pesar de los programas convencionales de limpieza, las bacterias adheridas pueden sobrevivir y proliferar en las superficies de los equipos que procesan alimentos; se ha comprobado que las bacterias adheridas son mucho más resistentes a los desinfectantes que las que se hallan en suspensión, y esta resistencia se ha atribuye al "escudo microbiano" que confieren los biofilms formados por diferentes especies de microorganismos y a la gran producción de sustancias poliméricas extracelulares (González, 2005).

La restricción de agua y nutrientes, el diseño del equipo y el control de temperaturas son factores fundamentales en el control de biofilm. Sin embargo, habitualmente no es posible reducir la disponibilidad de agua, rediseñar el equipo o reducir la temperatura de actuación, por lo que su control se centra en una limpieza y desinfección efectivas de los lugares con mayor potencial para su crecimiento (Chmielewsky y Frank, 2003).

El tratamiento de limpieza y desinfección del biofilm comprende un tratamiento físico que incorpora una limpieza mecánica y el uso de agua caliente, y un tratamiento químico que implica el uso de biocidas.

Según el *Australian Food Safety Centre of Excellence* (AFSCE, 2007) un proceso correcto de limpieza higiénica de una instalación alimentaria debe incluir las siguientes etapas:

1. Retirada de residuos y limpieza en seco.
2. Pre-lavado.
3. Lavado (aplicación del agente detergente).
4. Enjuague y posterior eliminación del exceso de agua.
5. Desinfección (aplicación del biocida o de agua a más de 80 °C) y enjuague posterior si es recomendado por el fabricante.
6. Secado higiénico.
7. Verificación de la eficacia y monitorización del sistema.

1. Limpieza

El proceso de limpieza se define como el conjunto de operaciones destinadas a eliminar la suciedad adherida a una superficie, sin alterar a ésta (AFSCE, 2007). Este proceso puede llegar a eliminar el 90% de los microorganismos de una superficie (Serra, 2003).

La principal limitación de los sistemas de limpieza reside en los problemas de accesibilidad a diversas zonas como ranuras, grietas, finales ciegos, etc. Si el biofilm queda como reservorio en estos puntos, la limpieza nunca podrá ser exhaustiva (Serra, 2003). Además un procedimiento de limpieza efectivo debe romper o disolver la matriz de sustancias poliméricas extracelulares asociada al biofilm, para permitir que los agentes higienizantes tengan acceso a la células bacterianas viables (Chmielewsky y Frank, 2003).

Existen varios métodos clásicos para la eliminación mecánica de biofilm como el cepillado, pero no es una opción muy factible para aéreas de difícil acceso. Más recientemente se emplean tratamientos con ultrasonidos, campos magnéticos o pulsos eléctricos solos o en combinación con ácidos orgánicos o biocidas.

El uso periódico de agua caliente puede ser empleado para eliminar las bacterias de biofilms. No obstante, se requieren temperaturas de 95 °C durante un periodo superior a 100 minutos lo que no hace muy práctico en determinadas situaciones.

La eliminación de las bacterias adheridas, de manera irreversible, es difícil y requiere de la aplicación de tratamientos físicos agresivos (cepillado o raspado), de tratamientos químicos (enzimas, detergentes, surfactantes, etc.) y/o de calor, los cuales provocan alteraciones en las superficies sobre las que se aplican (González, 2005).

Se ha podido demostrar que las condiciones de limpieza de una superficie tan inalterable como el acero inoxidable, cambia sus propiedades. En estudios comparativos llevados a cabo con materiales como el acero inoxidable, el cristal, el nylon o compuestos de polivinilo se demuestra que la limpieza puede eliminar igualmente las bacterias de cualquier superficie mientras sea nueva, pero es el acero inoxidable el que resiste mejor el desgaste que tiene lugar con el tiempo y el uso. Las irregularidades que llegue a presentar la superficie permitirán el alojamiento de bacterias y de materia orgánica y, por lo tanto han de limpiarse a fondo, pero se deberá guardar un cierto equilibrio entre la intensidad de la limpieza y el mantenimiento de los instrumentos (Serra, 2003).

Se ha observado que la limpieza con álcalis y especialmente con EDTA, son más efectivas que la limpieza con ácidos para eliminar el biofilm (Chmielewsky y Frank, 2003) (González, 2005).

2. Desinfección

La desinfección se define como el proceso que mediante la utilización de agentes químicos o físicos permite reducir a niveles insignificantes el número de microorganismos que hay en una superficie (AFSCE, 2007).

Biocidas

Los biocidas se definen como las sustancias activas y preparados que contengan una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos (Real Decreto 1054/2002).

La resistencia de los biofilms a la acción de los biocidas parece depender de la estructura tridimensional. Cuanto más viejo y grueso sea, mayor resistencia posee y a la inversa, si se desmonta la estructura pierde la resistencia. En consecuencia, la eficacia de la desinfección, estará directamente relacionada con la capacidad de la limpieza previa para desenganchar y desorganizar la matriz extracelular (Serra, 2003).

Asimismo, se ha comprobado que el hipoclorito sódico y los desinfectantes aniónicos son mejores para eliminar las sustancias poliméricas extracelulares excretadas por *Listeria* y *Salmonella* en acero inoxidable que los compuestos de amonio cuaternario y el yodo (González, 2005).

A continuación se expone una clasificación de los biocidas (Edstrom, 2003).

Biocidas oxidantes

Cloro. Es el biocida más efectivo y menos caro. No solo elimina las bacterias de biofilms, también destruye el polímero extracelular. Son necesarias concentraciones más elevadas de cloro para eliminar los biofilms que las bacterias libres. Altas concentraciones de cloro durante cortos periodos de tiempo son más efectivas que bajas concentraciones durante un tiempo elevado. Hay, sin embargo, una limitación al uso del cloro y la concentración empleada teniendo en cuenta que el cloro corroe el acero inoxidable.

Dióxido de cloro. Tiene una actividad similar al cloro. Presenta la dificultad de su inestabilidad, lo que le exige ser preparado *in situ*. Es también corrosivo de metales.

Ozono. Es aproximadamente dos veces más efectivo que el cloro a la misma concentración. Presenta el problema de su inestabilidad, debiéndose generar *in situ*, y el de su baja solubilidad en agua. Debe emplearse en materiales que sean resistentes al ozono.

Peróxido de hidrógeno (10% v). Es utilizado como biocida contra bacterias por su rápida degradación a agua y oxígeno. Su efectividad contra biofilms requiere de más estudios.

Biocidas no oxidantes

Compuestos de amonio cuaternario. Son efectivos surfactantes que ayudan a remover los biofilms de la superficie. Presenta el inconveniente de que su eliminación requiere un exhaustivo aclarado.

Formaldehído. Se ha utilizado principalmente en la industria farmacéutica. Su efectividad contra los biofilms es todavía cuestionada. No es corrosivo para el acero inoxidable.

El **hipoclorito sódico** y los **desinfectantes aniónicos** han demostrado ser más efectivos que los compuestos de amonio cuaternario para la eliminación de las sustancias poliméricas extracelulares excretadas por *Listeria* y *Salmonella* en acero inoxidable.

Existen métodos biológicos que han demostrado también un cierto éxito en la prevención y eliminación de biofilms, así la nisina, un péptido antimicrobiano aprobado para su uso en quesos, se ha empleado con éxito en la reducción del ataque de *L. monocytogenes* a la superficie.

Otros mecanismos de desinfección

En los últimos años se han venido desarrollando diferentes métodos físicos como alternativa al uso de biocidas. La tendencia futura será la aplicación de técnicas sostenibles de desinfección que reduzcan el uso de biocidas, disminuyendo la posible contaminación ambiental.

Algunos de los métodos que se han probado con éxito en los programas de desinfección son:

- **Radiación UV.** Se aprovecha la capacidad bactericida de las radiaciones ultravioletas C ($\lambda=254$ nm) para realizar la desinfección de materiales. Sólo desinfecta las partes del objeto en los que inciden los rayos de forma perpendicular. El tiempo necesario de exposición vendrá determinado en cada aparato, pero oscila entre 3 y 5 minutos para cada zona que sea necesario irradiar. Las radiaciones UV pueden aplicarse a cualquier tipo de material, sin embargo para los pinceles y otros instrumentos de cerdas es aconsejable utilizar otro sistema de desinfección previo, ya que es difícil que los rayos incidan en la base de las cerdas o en las zonas internas.
- **Desinfección solar fotocatalítica.** El método SODIS (Desinfección Solar del Agua) usa la energía solar para destruir los microorganismos patógenos que causan enfermedades transmitidas por el agua. Los microorganismos patógenos son vulnerables a dos efectos de la luz solar: la radiación en el espectro de luz UV-A (longitud de onda 320-400 nm) y el calor (incremento en la temperatura del agua). Se produce una sinergia entre estos dos efectos, ya que el efecto combinado de ambos es mucho mayor que la suma de cada uno de ellos independientemente. Ha demostrado ser efectiva en la eliminación de bacterias (*E. coli* O157H7, *V. cholerae*, *Salmonella* e. *Typhimurium*, *Shigella dysenteriae*), protozoos (*Cryptosporidium*, *Acanthamoeba*) y hongos (*Candida albicans*, *Fusarium solani*).
- **Filtración.** Este procedimiento es aplicable a la esterilización de líquidos mediante su paso a través de membranas porosas con diámetro de poro de 0,35 micras. Los filtros que se utilizan no retienen virus ni micoplasmas.
- **Campos electromagnéticos.** Método novedoso que se encuentra actualmente en desarrollo que permite la desinfección del agua mediante la exposición a campos electromagnéticos con frecuencias de entre 10 KHz y 8 GHz. Este método ha mostrado ser muy efectivo, más que el calentamiento.

to por métodos térmicos convencionales. Sin embargo, dependiendo de la bacteria a inactivar hay frecuencias que resultan más bactericidas que otras, por lo que se requieren más estudios hasta su utilización a nivel comercial.

Por último, cabe destacar que el diseño higiénico de las instalaciones y del equipo es la mejor medida preventiva, siendo además imprescindible el mantenimiento de las condiciones y de la correcta manipulación en todos los procesos (Serra, 2003).

Conclusiones del Comité Científico

La presencia de biofilms en la Industria alimentaria puede suponer un importante problema tanto tecnológico como de Salud Pública. Las características propias de esta forma de crecimiento bacteriano, que implica un comportamiento diferente ante los procesos de limpieza y desinfección de las células plactónicas frente a las que se han ensayado la mayoría de los agentes. Por lo tanto, la dificultad existente para eliminar estas formaciones una vez instauradas hace que la prevención sea, una vez más, la estrategia de elección a la hora de controlar este problema.

La heterogenicidad y condiciones de formación de los biofilms, que dependen de la bacteria o bacterias implicadas, la matriz en el que se encuentran, así como del proceso tecnológico, hace que sea muy difícil el realizar recomendaciones muy específicas a parte de aquellas genéricas que hemos expuesto y, por lo tanto, se hace necesario desarrollar investigaciones a este respecto.

Recomendaciones del Comité Científico

Como recomendaciones para evitar la formación y el desarrollo de biofilms se pueden citar:

1. Limpieza y desinfección

- Prever e identificar dónde se forman los biofilms: sitios con agua, materia orgánica y microorganismos contaminantes y lugares con limpieza y desinfección insuficiente.
- Poner a punto programas de limpieza y desinfección para la eliminación de los mismos.
- Cumplir rigurosamente todas las etapas del proceso de limpieza y desinfección en cada tratamiento.
- Rotar los productos químicos para evitar adaptación de los microorganismos.
- Evitar aerosoles y dispersión de la suciedad mezcladas con las soluciones de lavado (barrer, usar mangueras de presión).
- Inspección de los equipos tras la limpieza, tanto visual como microbiológica.
- Verificar periódicamente la eficacia de los métodos de limpieza y desinfección.

2. Diseño de los equipos e instalaciones

- Seleccionar equipos cuyo diseño minimice los puntos, internos o externos, donde puedan desarrollarse los biofilms y elegir equipos diseñados para reforzar la higiene:
 - Todas las áreas y partes deberían ser accesibles para la limpieza manual e inspección o fácilmente desmontables.

- Incluir suelos impermeables a la humedad y fáciles de limpiar.
- No emplear falsos techos con paneles desunidos que permiten incorporar fácilmente la suciedad.
- Los equipos incluidos en las líneas productivas deberían ser tan fáciles de limpiar como sea posible.
- Las soldaduras deben ser lisas y continuas.
- Los equipos deben incorporar sistemas de vaciado y drenado. Las superficies en contacto con los alimentos deben ser inertes, lisas y no porosas.
- Un programa de mantenimiento periódico de los equipos:
 - Las unidades dañadas, con picaduras o corroídas deben ser reparadas o sustituidas.
 - Reparar los equipos, o sus componentes, para prevenir la deposición de alimentos que más tarde podrían ser difícilmente eliminables.
 - Utilizar herramientas específicas para la reparación de maquinaria que interviene en la producción de precocinados. Limpiar las herramientas antes de cada uso.
 - Si se utiliza aire comprimido, mantener y sustituir regularmente los filtros.
- Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manipulación.

Referencias

- AFSCE (2007). Australian Food Safety Centre of Excellence. Cleaning and Sanitizing Factsheet. Disponible en: <http://www.foodscience.csiro.au/factsheets/sanitationfactsheet.pdf> [acceso: 1-12-2009].
- Bagge-Ravn, D., Gardshodn, K., Gram, L. y Fønnesbech, B.V. (2003). Comparison of sodium hypochlorite based foam and peroxyacetic acid based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: Survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 66 (4), pp: 592-598.
- Borucki, M.K., Peppin, J.D., White, D., Loge, F. y Call, D.R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, pp: 7336-7342.
- Boyd, R.D., Verran, J., Hall, K.E., Underhill, C., Hibbert, S. y West, R. (2001). The cleanability of stainless steel as determined by X-ray photoelectron spectroscopy. *Applied Surface Science*, 172 (1-2), pp: 135-143.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L. y Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13, pp: 20-26.
- Carpentier, B. y Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences with particular references to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, pp: 499-511.
- CDC (2008). Center for Disease Control and Prevention. *Escherichia coli*. Disponible en: http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/stec_gi.html [acceso: 10-11-2009].
- Chmielewsky, R.A.N. y Frank, J.F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, pp: 22-32.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. y Greenberg, E.P. (1999). Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, pp: 1318-1322.
- Costerton, J.W. (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15, pp: 137-140.
- Davey, M.E. y O'Toole, G.O. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4), pp: 847-867.
- Dirckx, P. y Davies, D. (2003). Five stages of biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. Disponible en: http://www.genomenetwork.org/articles/06_02/biofilms_image1.shtml
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), pp: 881-890.
- Donlan, R.M. y Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2), pp: 167-193.

- Edstrom (2003). Biofilms. The key to understanding and controlling bacterial growth in Automated Drinking Water Systems, Second Edition by Paula H. Dreeszen.
- EFSA (2007). European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2006. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/Zoon_report_2006_en,0.pdf?ssbinary=true [acceso: 10-11-2009].
- EFSA (2009). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Report/zoonoses_report_2007,3.pdf?ssbinary=true [acceso: 10-11-2009].
- Else, T.A., Pantle, C.R. y Amy, P.S. (2003). Boundaries for Biofilm Formation: Humidity and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, pp: 5006-5010.
- Fuster i Valls, N. (2006). Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. Disponible en: http://www.tesisenred.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX1005107165210//nfv1de1.pdf [acceso: 10-11-2009].
- Golovlev, E.L. (2002). The Mechanism of Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Type of Structured Population. *Microbiology*, 71 (3), pp: 249-254.
- González, F.R. (2005). Desarrollo y aplicación de sensores para evaluar la contaminación microbiológica de superficies domésticas españolas y de la efectividad de desinfectantes *in situ* de productos limpiadores comerciales. Disponible en: http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0119106-165553//fgr1de1.pdf [acceso: 13-10-2009].
- Hanning, I. y Slavik, M. (2009). *Campylobacter jejuni* as a primary colonizig biofilm former. *International Journal of Poultry Science*, 8 (1), pp: 1-6.
- Houdt, R.V. y Michiels, C.W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156, pp: 626-633.
- Joseph, B., Otta, S.K. y Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella spp.* on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64, pp: 367-372.
- Joshua, G.W.P., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A.V. y Wren, B.W. (2006). Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 152, pp: 387-396.
- Keskinen, L.A., Todd, E.C.D. y Ryser, E. (2008). Transfer of Surface-Dried *Listeria monocytogenes* from Stainless Steel Knife Blades to Roast Turkey Breast. *Journal of Food Protection*, 71, pp: 176-181.
- Kraigsley, A., Ronney, P.D. y Finkel, S.E. (2002). Dynamics of self-propagating fronts of motile bacteria. Disponible en: <http://carambola.usc.edu/research/biophysics/BacterialFronts.html> [acceso: 10-11-2009].
- Kumar, C.G. y Anand, S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, pp: 9-27.
- Lasa, I., del Pozo, J.L. y Penadés, J.R. (2009). Biofilms Bacterianos e infección. Disponible en: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol28/n2/colaba.html> [acceso: 13-10-2009].
- Lee Wong, A.C. (1998). Biofilms in Food Processing Enviroments. *Journal of Dairy Science*, 81, pp: 2765-2770.
- Mattila-Sandholm, T. y Wirtanen, G. (1992). Biofilm formation in the industry: A review. *Food Reviews International*, 8 (4), pp: 573-603.
- Murphy, C., Carroll, C. y Jordan, K.N. (2006). Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*, 100, pp: 623-632.
- Oteo, J. y Alós, J.I. (2009). *Listeria* y listeriosis. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/listeria.htm [acceso: 10-11-2009].
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R.M. y Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19, pp: 131-144.
- Real Decreto 1054/2002 de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas. BOE 247 de 15/10/2002, Sec 1, pp: 36188-36220.
- Reuter, M., Mallett, A., Pearson, B.M. y van Vliet, A.H. (2010). Biofilm formation in *Campylobacter jejuni* is increased

- under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. Disponible en: <http://aem.asm.org/cgi/reprint/AEM.01878-09v1?view=long&pmid=20139307> [acceso: 1-03-2010].
- Ryu, J.H. y Beuchat, L.R. (2005). Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 7, pp: 247-254.
- Ryu, J.H., Kim, H. y Beuchat, L.R. (2004). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *Journal of Food Protection*, 67, pp: 2123-2131.
- Serra, P.G. (2003). Estudio de biofilms: formación y consecuencia. Disponible en: <http://magno.uab.es/epsi/alimentaria/biofilm.pdf> [acceso: 13-10-2009].
- Silagyi, K.S. (2007). Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. Disponible en: <http://www.lib.umd.edu/drum/bitstream/1903/7806/1/umi-umd-5089.pdf> [acceso: 13-10-2009].
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, pp: 3-9.
- Todar, K. (2008). *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Disponible en: http://www.textbookofbacteriology.net/kt_toc.html [acceso: 10-11-2009].
- Vestby, L.K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E. y Nesse, L.L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 5:20. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-5-20.pdf> [acceso: 01-12-2009].
- WHO (2000). World Health Organization. *Campylobacter*. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/> [acceso: 1-12-2009].

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con la enfermedad celíaca y los problemas que plantean las técnicas analíticas para el control del contenido de gluten en los alimentos

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferrí, M^a Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-003

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 17 de febrero de 2010

Grupo de Trabajo

Manuel Martín Esteban (Coordinador)
Juan Francisco Cacho Palomar
Alberto Cepeda Sáez
Francisco Martín Bermudo
Isabel Prieto Santos (CNA-AESAN)

63

revista del comité científico n.º 12

Resumen

La enfermedad celíaca, requiere una dieta exenta de gluten. Con el fin de conocer las cantidades de gluten que contienen los productos alimenticios destinados a los celíacos, el Reglamento (CE) N° 41/2009 de la Comisión de 20 de enero de 2009 sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten, estableció que los productos alimenticios para personas con intolerancia al gluten, pueden llevar el término "exento de gluten", si el contenido de gluten no sobrepasa los 20 mg/kg en total y el término "contenido muy reducido en gluten", si el contenido de gluten no supera los 100 mg/kg en total, medidos ambos en los alimentos tal y como se venden al consumidor final. Este Reglamento será aplicable a partir del 1 de enero de 2012.

Resulta necesario disponer de técnicas analíticas cuya sensibilidad y especificidad, aseguren de manera fiable los contenidos de gluten establecidos.

Entre los métodos disponibles actualmente, los inmunológicos son los métodos de elección para la detección de gluten en alimentos. Existen además otros métodos de confirmación como la detección de proteínas por métodos no inmunológicos o la detección de ADN de cereales alergénicos.

Debido a que aún quedan problemas sin resolver en la determinación del contenido en gluten, este Comité considera necesario seguir trabajando en el desarrollo de nuevas tecnologías, buscando aumentar la sensibilidad y especificidad de los métodos existentes.

Palabras clave

Enfermedad celíaca, celíaco, alimentos, gluten, técnicas y métodos analíticos.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) with regard to coeliac disease and the problems posed by the analytical techniques for the control of gluten contents in food.

Abstract

Coeliac disease requires a gluten-free diet. In order to know the amounts of gluten contained in foodstuffs intended for people with coeliac disease, the European Commission's (EC) Regulation N° 41/2009 dated January 20th, 2009, concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten, established that the food products for people with gluten intolerance may use the term "gluten-free" if the gluten content does not exceed 20 mg/kg in total and the term "very low gluten content" if the gluten content does not exceed 100 mg/kg in total, both measured in the foodstuff as sold to the final consumer. This Regulation will come into force on January 1st, 2012.

It is necessary to have available analytical techniques with sufficient sensitivity and specificity to ensure the reliability of the gluten contents established.

Among the methods currently available, immunological methods are the first choice for the detection of gluten in foodstuffs. In addition, there are other confirmatory methods such as the detection of proteins by non-immunological methods or the detection of the DNA of allergenic cereals.

Since there are still unresolved problems in the determination of gluten contents, this Committee considers it is necessary to continue working on the development of new technologies, seeking to increase the sensitivity and specificity of the existing methods.

Key words

Coeliac disease, celiac, foodstuffs, gluten, analytical techniques and methods.

Introducción

Ante el problema que representa una dieta de eliminación correcta en la enfermedad celíaca, el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2005) redactó un breve documento de opinión con la conclusión de que no se disponía de datos suficientes que permitieran establecer un umbral de seguridad, en relación con la ingesta de gluten, válido para todos los celíacos. Ante esa situación, el Comité Científico recomendaba, entre otros aspectos, la necesidad de incluir las cantidades de gluten que contienen los alimentos en la información nutricional de los productos manufacturados destinados a pacientes celíacos, así como la utilización de métodos precisos y fiables, con suficiente sensibilidad, y especificidad para la determinación de gluten en los alimentos.

Posteriormente, un documento de la Unión Europea aconseja, en base a los conocimientos actuales, un contenido máximo de 20 mg de gluten por kg de producto final, en los llamados "alimentos exentos de gluten" como un valor que puede ser suficientemente seguro para la mayoría de los pacientes celíacos (UE, 2009). Sin embargo, con el progreso de los conocimientos sobre esta enfermedad, es posible que esta recomendación cambie.

Si ya es problemático realizar un tratamiento correcto, suficientemente seguro, de la enfermedad celíaca, las dificultades aumentan si no se dispone de instrumentos adecuados para medir esas cantidades de gluten permitidas. Por lo tanto, parece justificada la necesidad de disponer de métodos suficientemente validados que permitan una cuantificación fiable de gluten en los alimentos, así como que su límite de detección sea lo suficientemente bajo para su aplicación en caso de variación de las cifras umbral consideradas seguras.

En este documento se revisa la situación actual del tratamiento de la enfermedad celíaca, de la necesidad de una dieta correcta y del nivel umbral aceptable de contenido en gluten en los alimentos. En base a ello, se hace un estudio crítico de los métodos disponibles actualmente para la cuantificación de gluten en alimentos, subrayando sus ventajas e inconvenientes.

El problema de la enfermedad celíaca

La enfermedad celíaca es un proceso inflamatorio intestinal producido por una respuesta inmune anómala, de carácter permanente, a proteínas (prolaminas) del gluten de la dieta, en sujetos susceptibles genéticamente (Koning et al., 2005). Con una prevalencia aproximada de 1 por 100-200, la enfermedad celíaca es la enteropatía inducida por alimentos más frecuente en el mundo occidental (Rostom et al., 2006). En España este valor oscila, en el niño, entre 1/100 y 1/70 (Polanco, 2008) y sobre 1/350 en el adulto (Casellas, 2006). Estas cifras pueden ser, incluso, más elevadas, teniendo en cuenta que hay muchos pacientes, con formas silentes o asintomáticas, no diagnosticados.

Se trata de una enfermedad multifactorial (factores genéticos, ambientales e inmunológicos) con una fuerte asociación HLA (Kagnoff, 2007). La enfermedad celíaca es una de las enfermedades de base genética más frecuente (Green y Jabri, 2003). Aproximadamente el 95% de los pacientes celíacos son HLA-DQ2 y el resto es habitualmente HLA-DQ8. Se necesita la presencia de estos haplotipos para el desarrollo de la enfermedad y su ausencia prácticamente excluye el diagnóstico (Green et al., 2001). Sin embargo, hasta un 45% de la población general tiene estos haplotipos HLA (NIH, 2005).

Su base es una enteropatía autoinmune, asociada con diversos grados de malabsorción, y afectación multisistémica. Sus síntomas y signos son muy variables (Green y Cellier, 2007), por lo que no son buenos

indicadores de enfermedad activa. La manifestación más típica de la enfermedad celíaca es la diarrea crónica con pérdida de peso, pero una gran proporción de pacientes tienen signos extradigestivos, como retraso del crecimiento, anemia, lesiones cutáneas (dermatitis herpetiforme), hipertransaminasemia aislada, osteopenia, infertilidad, ataxia o polineuropatía, etc. (NIH, 2005). Además, muchos pacientes tienen solo síntomas leves o, incluso, inaparentes, por lo que son difíciles de diagnosticar correctamente. El indicador definitivo de la lesión producida por el gluten es la histopatología de la mucosa del intestino delgado (Catassi et al., 2007).

El gluten

El gluten constituye las proteínas de reserva, insolubles en agua o sales, del trigo y otros cereales, denominadas, en el caso del trigo, gliadina y glutenina, ambas involucradas en la enfermedad celíaca. Estas proteínas tienen un elevado contenido de prolina (Shewry, 1995), por lo que se conocen, en conjunto, como prolaminas y se identifican habitualmente con técnicas electroforéticas.

El término gluten es científicamente impreciso y su definición varía, incluso cuando se aplica a alimentos exentos de gluten. Actualmente, el *Codex Alimentarius* define al gluten como "una fracción proteica del trigo, centeno, cebada, avena, de sus variedades híbridas y sus derivados, al que algunas personas son intolerantes, y que es insoluble en agua y en ClNa 0,5 M" (CODEX, 2008) (Tabla 1).

Tabla 1. Fracciones proteicas de los granos de cereales (fracciones de Osborne)

Fracción	Trigo	Centeno	Cebada	Avena	Maíz	
Globulina	Edestina					
Albúmina	Leucosina					
Gluten	Prolamina	Gliadina	Secalina	Hordeína	Avenina	Zeina
	Glutelina	Glutenina	Secalinina	Hordenina	Avenalina	Zeanina

Existen al menos cuatro clases de gliadinas monoméricas: α , β , γ y ω -gliadina. La identificación de cuál es la secuencia responsable de la acción nociva de las distintas prolaminas es uno de los mayores retos, y siguen haciéndose esfuerzos para obtener una información precisa al respecto.

Debido a su alto contenido en prolina, las proteínas del gluten se degradan con gran dificultad por las enzimas del tracto gastrointestinal (Shan et al., 2002). En el intestino delgado de los celíacos las proteínas del gluten, parcialmente degradadas, son modificadas por la actividad de la enzima transglutaminasa tisular (TGt) (Arentz-Hansen et al., 2000). En las proteínas del gluten se han identificado al menos 50 epítomos estimuladores de células T, de los que un péptido 33-mer de la α -gliadina parece ser el más inmunógeno (Shan et al., 2002). Este péptido contiene seis epítomos parcialmente superpuestos y es resistente a la degradación por las enzimas gástricas, pancreáticas y del borde en cepillo de la mucosa intestinal.

Tratamiento de la enfermedad celíaca

En la actualidad, el único tratamiento posible de la enfermedad celíaca es una alimentación rigurosamente exenta de gluten por toda la vida. Incluso pequeñas cantidades pueden ser nocivas. Esta dieta, aunque realizable, es muy complicada, debido al amplio uso en la industria alimentaria de cereales que contienen gluten y también como componente de diversos productos que habitualmente no se

asocian con gluten o trigo, como los medicamentos. Además, la dieta sin gluten implica importantes restricciones en la vida social del celíaco (Mearin, 2007).

En la mayoría de los celíacos la eliminación del gluten de la dieta conduce a una desaparición de los síntomas clínicos, normalización de los marcadores serológicos y recuperación de las lesiones de la mucosa duodenoyeyunal, así como la prevención de las complicaciones de la enfermedad celíaca, como el cáncer gastrointestinal (Fasano y Catassi, 2001). Su reintroducción en cualquier momento de la evolución causa reactivación de los síntomas, reaparición de la lesión intestinal y aumento de los niveles de anticuerpos anti-TGt tisular y antigliadina. La comprobación de esta respuesta es necesaria para un diagnóstico seguro de enfermedad celíaca.

En esta dieta están implicados los cereales con gluten, trigo, centeno, cebada, variedades híbridas y derivados. Diversos estudios clínicos indican que la avena es tolerada por gran parte de celíacos y puede mejorar y ampliar el contenido de la dieta y, sobre todo, la calidad de vida de los pacientes (Peraaho et al., 2004). Dado que desde el punto de vista molecular existen diferencias significativas entre las aveninas y las prolaminas de trigo, cebada y centeno, se postuló que las aveninas no estarían involucradas en la patología. En algunos países donde el consumo de avena es importante, la comprobación de su inocuidad permitiría incluirla libremente en la dieta sin gluten. Algunos estudios en los que se ha incluido un elevado número de celíacos describen que la avena sería tolerada (Janatuinen et al., 2002). Sin embargo, otros trabajos (Lundin et al., 2003) muestran que en la provocación con avena ciertos pacientes desarrollan las alteraciones histológicas típicas, con presencia de linfocitos T específicos para aveninas en la lamina propia. Por otra parte, desde un punto de vista práctico existen innumerables ocasiones en las que puede ocurrir contaminación con prolaminas nocivas (cultivo mixto en los campos, almacenamiento, molienda o transporte donde normalmente se almacena, muele o transporta trigo, etc.) (Thompson, 2003). Por esta razón, particularmente en países donde mayoritariamente se produce y consume trigo, se considera que los productos a base de avena no son inocuos o naturalmente no nocivos y deben ser analizados.

Dieta exenta de gluten. El nivel umbral

Los celíacos requieren una estricta dieta libre de gluten que sólo es posible si los productos que consumen son correctamente evaluados en cuanto a su contenido de prolaminas.

Sin embargo, dado que no existe un modelo animal adecuado de la enfermedad, y que las pruebas *in vivo* y *ex vivo* presentan una gran variabilidad, ha resultado difícil establecer con certeza la cantidad máxima de prolaminas nocivas tolerada por un enfermo celíaco. Por razones éticas los estudios hechos se han realizado en grupos pequeños de pacientes y controles, sin poder establecer conclusiones definitivas (Hischenhuber et al., 2006).

Por supuesto, una dieta completamente exenta de gluten sería lo ideal, pero, por ahora, es algo inalcanzable. Incluso los productos naturalmente libres de gluten pueden contener cantidades significativas (Collin et al., 2004). Además, unos límites demasiado rigurosos podrían ocasionar una disponibilidad muy reducida de productos sin gluten, lo que dificultaría aún más el cumplimiento de la dieta. Por otro lado, la sensibilidad al gluten es variable en cada celíaco (Collin et al., 2007), lo que complica más aún la elección de unos límites aceptables de trazas de gluten en los alimentos sin gluten.

Está aceptado que la prueba de provocación con gluten es el patrón-oro para la comprobación del nivel de tolerancia al gluten. En un estudio reciente (Catassi et al., 2007) en doble ciego controlado con placebo, realizado para establecer un umbral seguro de gluten en pacientes con enfermedad celíaca, se ha observado que la mayoría de los celíacos deben ingerir menos de 50 mg al día. No obstante, hay que interpretar estos resultados con precaución, debido al limitado número de pacientes investigados (20 pacientes) y a la corta duración de la provocación (tres meses). Además, esta dosis diaria umbral debe relacionarse con la ingesta real, donde la cantidad ingerida depende de la concentración de prolaminas en cada producto y de la cantidad que se ingiere de cada alimento. Es posible realizar estimaciones basadas en encuestas de hábitos nutricionales y establecer un valor de referencia para redefinir los límites del contenido de gliadinas de los productos libres de gluten. Las estimaciones realizadas sugieren que el valor de 20 partes por millón (ppm)¹ de gluten es un valor suficientemente seguro para la mayoría de los pacientes celíacos. Sin embargo, se considera si es necesario sugerir un valor más bajo para incrementar la seguridad en la dieta ya que puede haber errores involuntarios en la ingesta y la presencia de individuos con una mayor sensibilidad al gluten.

Alimentos exentos de gluten. Normativa

La mayor parte de los países europeos han aceptado la definición de "exento de gluten" del *Codex Alimentarius* (CODEX, 2008) que establece el contenido de gluten en los productos libres de gluten. Propuso inicialmente el uso de dos límites para la identificación de productos para consumo por pacientes celíacos: 20 ppm de gluten para productos naturalmente libres de gluten y 200 ppm de gluten para productos manufacturados como libres de gluten. Como las gliadinas representan, aproximadamente el 50% del gluten, también puede decirse que los alimentos aptos para el consumo por los celíacos no deben contener más de 10 ppm de gliadinas.

Estos límites están en permanente revisión, y en la propuesta vigente de la Comisión del *Codex Alimentarius* se establecen dos niveles (CODEX, 2008):

1. Alimentos exentos de gluten.

- a) están constituidos por, o son elaborados con, uno o más ingredientes que no contienen trigo (es decir todas las especies de *Triticum*, como trigo duro, la espelta y el kamut), centeno, cebada, avena o sus variedades híbridas, y cuyo contenido en gluten no sobrepase los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor; o
- b) están constituidos por uno o más ingredientes procedentes del trigo (es decir todas las especies de *Triticum*, como trigo duro, la espelta y el kamut), centeno, cebada, avena o sus variedades híbridas, que han sido procesados de forma especial para eliminar el gluten y cuyo contenido en gluten no sobrepase los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor.

2. Alimentos procesados de forma especial para reducir el contenido de gluten a un nivel comprendido entre 20 mg/kg y 100 mg/kg. Estos alimentos están constituidos por uno o más

¹Una parte por millón (ppm) equivale a 1mg/kg.

ingredientes procedentes del trigo (es decir todas las especies de *Triticum*, como trigo duro, la espelta y el kamut), centeno, cebada, avena o sus variedades híbridas que han sido procesados de forma especial para reducir el contenido de gluten a un nivel comprendido entre 20 mg/kg y 100 mg/kg en total medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor.

Estos valores han sido adoptados por la Comisión de las Comunidades Europeas (UE, 2009) que serán aplicables a partir de enero de 2012. En este Reglamento se establecen como alimentos que pueden llevar en el etiquetado el término "exentos de gluten", aquellos en los cuales el contenido de gluten no sobrepasa los 20 mg/kg y con la mención "contenido muy reducido de gluten" aquellos alimentos que han sido tratados de forma especial para eliminar el gluten cuando no contengan un nivel que supere los 100 mg/kg.

Métodos de detección de gluten en alimentos

Los métodos disponibles actualmente para la determinación del contenido de gluten en alimentos pueden clasificarse así:

1. Métodos de análisis basados en la detección de proteínas

El principal objetivo de los métodos de detección de gluten en alimentos destinados al consumo por pacientes celíacos, es la detección de las proteínas alergénicas en los alimentos elaborados a partir de cereales que contiene prolaminas nocivas.

La detección de proteínas puede realizarse de forma fácil y fiable en muestras de alimentos frescos o procesados, siempre y cuando el procesamiento no haya afectado a dichas proteínas. Además, es necesario disponer de muestras con un contenido proteico en cantidad suficiente.

Técnicas inmunológicas

Una de las herramientas más eficaces, es el desarrollo de metodologías basadas en técnicas inmunológicas, con la utilización de anticuerpos específicos frente a las fracciones nocivas del gluten.

La obtención de estos anticuerpos con suficiente calidad y especificidad es uno de los principales retos en el desarrollo de los métodos inmunológicos de detección de gluten, debido, principalmente, a que no están claramente identificadas la fracción o fracciones nocivas del gluten. En consecuencia, es posible que un elevado número de péptidos derivados de α , β , γ y ω -gliadinas y, como se ha comprobado recientemente, de las gluteninas del gluten, puedan estar implicados en el desencadenamiento de la enfermedad celíaca.

Los primeros métodos inmunológicos de detección de gluten se desarrollaron en base a la obtención de anticuerpos policlonales frente al conjunto de prolaminas del trigo. En 1991, Skerritt y Hill desarrollan el primer método basado en la obtención de un anticuerpo monoclonal frente a la fracción más termorresistente de las gliadinas (ω -gliadinas). El método fue considerado como primer método oficial de la AOAC. Posteriormente se comprobó que el método presentaba una menor sensibilidad en comparación con nuevos métodos diseñados frente a otras fracciones nocivas debido a que, las ω -gliadinas constituyen la fracción minoritaria de las prolaminas del gluten, lo que ha llevado a que este momento el método se encuentre en desuso.

En la actualidad, los métodos con mayor aceptación son los basados en la utilización del anticuerpo monoclonal R5 obtenido frente al pentapéptido (QQPFP) potencialmente nocivo que se encuentra repetidamente en las subfracciones α , β , γ y ω -gliadinas, así como en secalinas y hordeínas. Este anticuerpo ha servido como base para el desarrollo de los métodos ELISA más utilizados actualmente (Valdés et al., 2003).

No obstante, estudios científicos recientes, también implican a las gluteninas en la responsabilidad de desencadenar la respuesta anómala al gluten (Dewar et al., 2006) (Howdle, 2006). Los estudios de estas investigaciones parecen indicar que péptidos derivados de ambos grupos, gliadinas y gluteninas, son inmunostimuladores en la enfermedad celiaca y que existe una alta probabilidad de que las gluteninas sean también nocivas. En consecuencia, se están desarrollando métodos analíticos que sean capaces de detectar tanto las gliadinas como las gluteninas.

Además, el desarrollo de anticuerpos para la detección de gluten en alimentos plantea la dificultad de que las proteínas pierden su estructura terciaria cuando se desnaturalizan debido a cambios de presión, temperatura, concentración de sales o procesos de hidrólisis enzimática o química a los que pueden ser sometidas durante el procesado o elaboración de alimentos.

Dentro de los métodos inmunológicos se incluyen:

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay* o ensayo ligado a enzima, enzoinmunoanálisis)

La técnica ELISA es un método inmunológico clásico y quizá uno de los más utilizados. Los métodos ELISA son adecuados para análisis rutinarios a gran escala, ya que se realizan con rapidez y proporcionan una alta sensibilidad siempre y cuando, como se ha mencionado anteriormente, las proteínas no se encuentren desnaturalizadas y se disponga del anticuerpo adecuado.

Como inconvenientes en la utilización de las técnicas ELISA hay que considerar la posible aparición de falsos negativos, como consecuencia de la incapacidad de los anticuerpos para reconocer las proteínas alteradas durante el procesado en algunos alimentos. También hay la posibilidad de que se produzcan reacciones cruzadas entre especies estrechamente relacionadas, dando lugar a la aparición de falsos positivos. A pesar de esto, por el momento podemos considerar los métodos ELISA como la herramienta clave para la determinación de gluten en alimentos.

Los métodos ELISA diseñados mediante un sistema de doble anticuerpo (ELI tipo sándwich), utilizando el anticuerpo monoclonal R5, citado anteriormente (Valdés et al., 2003) (Méndez et al., 2005), son los más utilizados actualmente para el análisis cuantitativo de gliadina de trigo y las prolaminas correspondientes de centeno y cebada en alimentos. Están considerados método de análisis Tipo I por el *Codex Alimentarius* (CODEX, 2008) para la determinación de gluten en alimentos y son los métodos recomendados por el *Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity* (WGPAT).

El anticuerpo monoclonal R5 reconoce el epitopo QQPFP considerado como tóxico y un péptido de 33-mer que se encuentra repetidas veces en las fracciones α , β , γ y ω de las prolaminas y que responde por igual frente a las prolaminas de trigo, cebada y centeno. Sin embargo, el anticuerpo R5 no reconoce las posibles fracciones tóxicas de la avena.

Mediante los métodos ELISA utilizando el anticuerpo R5 es posible alcanzar límites de cuantificación de gluten en alimentos de 5 ppm (5 mg/kg) (Tabla 2).

Tabla 2. Límites de detección de los métodos inmunológicos de gluten*

Métodos de detección de gluten	Límite de detección	Límite de cuantificación (ppm de gluten)
ELISA Sándwich anticuerpo R5	3 ppm	5 ppm
Otros ELISA Sándwich con otros anticuerpos		3-10 ppm
Tiras Inmunocromatográficas	2-4 ppm	
Western Blot		8 ppm

*Datos del Centro Nacional de Alimentación (AESAN).

Existen en el mercado otros sistemas ELISA tipo sándwich desarrollados para la detección de gluten en alimentos que utilizan anticuerpos monoclonales y/o policlonales diferentes al R5 y que igualmente son capaces de detectar fracciones nocivas del gluten. Los límites de cuantificación declarados por estos sistemas se encuentran entre 3 y 10 ppm de gluten (3 y 10 mg/kg).

Los sistemas descritos, ELISA tipo sandwich, declaran su aplicabilidad a la detección de gluten en todo tipo de alimentos crudos y procesados excepto en alimentos hidrolizados, y/o altamente procesados como, almidones, bebidas alcohólicas, siropes, etc. en los que el gluten debido a tratamientos térmicos o enzimáticos como parte del proceso de elaboración del alimento, se encuentra fragmentado en fracciones incapaces de ser reconocidas por los anticuerpos. Esta fragmentación puede originar pequeños péptidos que no son reconocidos por los anticuerpos y sin embargo pueden contener secuencias de los epitopos nocivos para los enfermos celíacos.

Este problema se ha intentado solucionar mediante el desarrollo de sistemas "ELISA competitivos". Estos sistemas requieren un único epitopo activo para reaccionar con el anticuerpo frente a los ELISA tipo sándwich que necesitan más de un epitopo activo para poder construir, el complejo sándwich (anticuerpo-antígeno-anticuerpo) fundamento del método.

Los sistemas ELISA competitivos relacionan el contenido total de gluten en alimentos con la cantidad de posible péptido tóxico, expresando el resultado en forma de $\mu\text{g/g}$ de péptido equivalente. El problema es que, hasta el momento, no se ha podido establecer una forma clara de relación entre la cantidad de péptido cuantificado y la cantidad total de gluten en alimento. En estudios presentados en la 22ª Reunión de WGPAT se muestra que debido al desconocimiento de cómo se produce la fragmentación de las gliadinas en péptidos más pequeños y que ésta puede variar de muestra a muestra, es difícil establecer un factor real de conversión de péptidos en gliadinas (Janssen et al., 2007) (Immer et al., 2007).

Tiras inmunocromatográficas

Algunas casas comerciales han desarrollado métodos inmunocromatográficos o de detección de Flujo Laminar (LFS) para la búsqueda de gluten en alimentos. Estos sistemas utilizan dos anticuerpos inmovilizados en membrana formando líneas separadas a través de ella. Un anticuerpo es específico frente a las proteínas alergénicas de gluten y el otro sirve como control del sistema.

La utilización de tiras inmunocromatográficas, sistema de sencillo manejo y muy rápido, únicamente debe ser tenida en cuenta como método cualitativo de detección y no como sistema cuantitativo, debido a que muestra poca precisión, y sólo puede servir para dar una información orientativa del contenido de gluten.

Otra de las limitaciones de estos sistemas es el tipo de productos sobre los que pueden ser aplicados, debido a que algunos alimentos por su composición o tratamiento pueden presentar algún tipo de interferencia. Estos métodos pueden ser considerados de utilidad como sistemas de *screening* sobre materias crudas y productos poco procesados.

Al igual que sucede con los sistemas ELISA, podemos encontrar en el mercado diferentes sistemas inmunocromatográficos desarrollados en base a la utilización de distintos anticuerpos. Estos sistemas declaran una sensibilidad de entre 2 a 4 ppm de gluten (2 a 4 mg/kg).

Western Blot

La técnica de Western Blot es un método inmunológico altamente específico que suministra la información cualitativa y cuantitativa necesaria para detectar proteínas en muestras complejas. Consiste en la extracción de las prolaminas del alimento, seguida de su separación electroforética en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), la posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa y finalmente la incubación con anticuerpos específicos frente a gliadinas de trigo marcados para poder luego ser revelados mediante una reacción enzimática.

Como ventajas de las técnicas de Western Blot, frente a los sistemas ELISA, podemos destacar que son métodos altamente específicos y que suministran más información cualitativa y cuantitativa que los sistemas ELISA ya que las proteínas extraídas se someten a una separación mediante electroforesis, antes de la hibridación con anticuerpos específicos en la membrana. La separación electroforética nos aporta información sobre el peso molecular de las proteínas extraídas.

Otra ventaja es una mayor eficacia en la detección de proteínas insolubles. La separación de las proteínas se realiza en condiciones desnaturizantes, es decir, en condiciones que provocan la ruptura de los enlaces que mantienen la estructura de las proteínas, lo que puede favorecer la solubilidad de dichas proteínas.

Como limitaciones al método, hay que considerar que es mucho más difícil de llevar a cabo y requiere mayor formación y especialización. La principal limitación en la aplicación de esta tecnología a la detección de gluten en alimentos, hoy por hoy, es la falta de disponibilidad de anticuerpos comerciales específicos y fiables, para poder detectar con mayor especificidad las gliadinas y otras prolaminas alergénicas. Por el momento únicamente se distribuye comercialmente un anticuerpo policlonal obtenido frente a las gliadinas de trigo, que muestra una gran afinidad por las proteínas alergénicas de trigo, cebada, centeno y avena, pero que simultáneamente muestra reacción cruzada con otros cereales no alergénicos.

Mediante Western Blot es posible conseguir un límite de cuantificación de gluten de 8 ppm (8 mg/kg) en alimentos.

Limitaciones de las técnicas inmunológicas

La extracción del gluten de los alimentos procesados es uno de los principales inconvenientes, y uno de los retos a alcanzar para poder llegar a desarrollar técnicas de detección fiables y exactas. Cuando las proteínas se desnaturizan durante el procesado de los alimentos puede suceder que los anticuerpos específicamente diseñados no reconozcan sus antígenos específicos, llegando a dar resultados erró-

neos, como falsos negativos. Por otro lado, también pueden dar lugar a reacciones cruzadas entre proteínas estrechamente relacionadas y originar errores como falsos positivos.

La mayoría de los alimentos destinados al consumo por pacientes celíacos están formados por matrices complejas de proteínas y otros compuestos. Algunas sustancias presentes en estas matrices tales como surfactantes, compuestos fenólicos, ácidos grasos, fosfatasa endógenas y otras enzimas, son capaces de inhibir las interacciones específicas entre el antígeno y el anticuerpo.

La búsqueda de un método que garantice la extracción total del contenido de gluten en alimentos es por el momento uno de los grandes objetivos para garantizar métodos de cuantificación seguros y fiables. La extracción de las prolaminas alergénicas del gluten mediante etanol al 60% ha sido hasta hace unos años el método más utilizado para la extracción de las prolaminas en muestras de alimentos. Sin embargo, se ha comprobado que debido al hecho de que las prolaminas interactúan mediante sus puentes disulfuro con otras prolaminas y con el resto de componentes existentes en las matrices complejas de los alimentos, la efectividad de la extracción mediante etanol al 60% es baja. Para incrementar la solubilidad de las prolaminas se ha propuesto y generalizado en los últimos años la utilización de agentes reductores como 2-mercaptoetanol y agentes desnaturizantes como clorhidrato de guanidina simultáneamente con el etanol en los procesos de extracción ("Solución cocktail") (García et al., 2005). La incorporación de estos componentes al proceso de extracción parece ser una herramienta adecuada para facilitar la extracción de gluten en los alimentos procesados. Sin embargo, recientemente se han publicado trabajos que afirman que estas sustancias reductoras y desnaturizantes pueden afectar a la reactividad del anticuerpo, causando interferencias en la interacción del antígeno con el anticuerpo y conduciendo a errores en la cuantificación del contenido de gluten (Doña et al., 2008). Además, hay que tener en cuenta que existen diferentes tipos de matrices entre los alimentos factibles de ser consumidos por los pacientes celíacos en los que la extracción de las prolaminas resulta difícil. Por ejemplo, cervezas y otras bebidas alcohólicas, siropes, salsas de soja, productos con alto contenido en grasas y taninos, chocolates, alimentos hidrolizados, maltodextrinas, almidones, preparados de alimentación infantil a base de frutas, lo que hace cuestionar la capacidad de los métodos analíticos para ese tipo de productos.

Otra de las grandes dificultades con las que nos debemos enfrentar a la hora del desarrollo y control de los métodos de análisis de gluten es la carencia de Material de Referencia de Valor Certificado de contenido de gluten o gliadina. Actualmente, se dispone de un Material de Referencia denominado "PWG-gliadin" que consiste en gliadina liofilizada aislada de una mezcla de trigos procedentes de distintos cultivos y preparada por el *Prolamin Working Group* (PWG-gliadin), para poder ser utilizado como material de referencia. Sus características han sido bien establecidas (Eckert et al., 2006).

Técnicas no inmunológicas

La identificación de proteínas mediante el empleo del denominado "mapeo de masas" o huella peptídica, englobada en el área denominada como proteómica, es una de las principales aplicaciones de la espectrometría de masas.

La posibilidad de la aplicación de estas potentes herramientas no inmunológicas (la espectrometría de masas, MALDI/TOF-MS, cromatografía líquida-espectrometría de masas), a la detección de gluten en

alimentos tiene como ventaja que, a diferencia de los métodos ELISA y Western Blot (*Inmunoblotting*), permite identificar prolaminas de trigo, cebada, centeno y avena sin necesidad de utilizar anticuerpos específicos frente a las prolaminas, uno de los puntos más críticos y problemáticos de los métodos disponibles actualmente.

El fundamento de los métodos se basa en la comparación de los perfiles de las proteínas extraídas del alimento frente a los perfiles característicos (espectros de masas) de las diferentes prolaminas extraídas de estándares de cereales.

El método es rápido, el manejo e interpretación rutinarios de los espectros es relativamente sencillo, la manipulación de la muestra fácil y reproducible y el costo del análisis es bajo. Sin embargo, el equipo es costoso, no accesible a cualquier laboratorio, y requiere instalaciones amplias, siendo complejo el proceso de elaboración de bibliotecas de perfiles de espectros y la calibración del equipo.

2. Métodos de análisis basados en la detección de ADN

Los métodos analíticos basados en la detección de ADN son eficaces cuando el alimento ha sido procesado o bien tratado físico-químicamente (calor, presión, etc.), ya que la proteína puede haberse desnaturalizado o degradado en el proceso, y los métodos analíticos de proteína se ven afectados por estos cambios. El ADN, en cambio, puede haberse fragmentado durante el proceso en trozos pequeños, pero ello no implica necesariamente que no puedan ser detectados. Aunque el ADN también se degrada durante la esterilización por calor en el procesado de enlatado de alimentos, todavía es posible obtener pequeños fragmentos con suficientes diferencias de secuencia como para hacer posible la diferenciación entre especies cercanas.

Sin embargo, dada la característica funcional de las prolaminas como proteínas alergénicas, los métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos suministran una información parcial e incompleta cuando son aplicados al análisis rutinario del contenido de gluten en alimentos, al no dar información sobre la integridad y funcionalidad de los epitopos (péptidos alergénicos) de las proteínas responsables de originar la reacción alérgica. En este sentido, lo que se detecta es ADN, pero es la proteína o sus péptidos la sustancia alergénica, y no se sabe qué grado de traducción a proteínas tiene el ADN detectado.

En realidad, la información que se adquiere con estos análisis es la confirmación de la presencia en el material analizado de una determinada especie vegetal, aunque se desconoce la integridad y funcionalidad de la misma en el momento del análisis. En lo que respecta al gluten, tiene mucho más interés funcional detectar la proteína o los péptidos alergénicos que el ADN.

Las técnicas basadas en la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y actualmente PCR en tiempo real pueden ser fácilmente aplicadas a la detección de ADN de gluten en alimentos.

Mediante PCR podemos aumentar o amplificar la cantidad de ADN que se pretende detectar. La elección de una adecuada secuencia diana hacia la que se dirige la amplificación, así como el diseño de los cebadores (*primers*) y el tamaño del fragmento amplificado son de vital importancia para conseguir un resultado adecuado.

La detección de fragmentos específicos de ADN, mediante la realización de tantas PCRs selectivas como se considere conveniente para identificar las distintas variedades vegetales implicadas en la acción nociva del gluten, permiten confirmar la presencia de ADN de una determinada especie vegetal u otra en la muestra de alimento (ADN de trigo, cebada, centeno, etc.).

3. Nuevas metodologías

Empiezan a ser aplicadas nuevas tecnologías a la detección de gluten en alimentos basadas en la utilización de biosensores. Estos dispositivos aportan como ventajas la posibilidad de automatizar y miniaturizar tanto la extracción como la detección de gluten de una forma sencilla y rápida. El inconveniente es la dificultad del desarrollo y el alto coste de utilización de forma rutinaria de estos sistemas una vez comercializados.

Se han descrito sistemas de biosensores, utilizando proteínas recombinantes y de inmunosensores electroquímicos, basados en la utilización de un anticuerpo desarrollado frente a un epítipo dominante en la fracción nociva del gluten (Nassef et al., 2008), para su aplicación a la detección de gluten. Según los autores, algunos de los estudios desarrollados muestran una excelente correlación entre los resultados obtenidos por estos novedosos sistemas y la técnica ELISA, por lo que estos sistemas podrán en un futuro ser aplicados al análisis de gluten en alimentos crudos y procesados.

Problemas generales planteados por los métodos de medición de gluten

Son varios los problemas planteados en la determinación de gluten, aún por resolver.

No está estudiada la relación entre los valores de gluten medidos en los alimentos y su nocividad en pacientes celíacos. Los procedimientos de determinación de gluten no se han valorado mediante ensayos clínicos (Lester, 2008).

La composición exacta del gluten varía entre especies y tipos de cereales, así como su forma de cultivarlos. Además, la industria alimentaria utiliza procedimientos en la preparación de ingredientes y alimentos que modifican el gluten física, química o enzimáticamente. Estas modificaciones pueden afectar la solubilidad del gluten, sus asociaciones intermoleculares, así como la capacidad de acceso a los epítopos significativos, o a su estructura. Es lógico que todos estos factores influyan en los protocolos de determinación de gluten, tanto durante la extracción como la inmunodetección.

Probablemente, la mayor dificultad para la determinación de gluten en los alimentos es conseguir una correcta normalización de las mediciones. Se ha considerado que la parte más soluble del gluten, la gliadina, es el mejor patrón para la determinación de gluten, pero puede que no se corresponda exactamente con el gluten presente en cada caso. El avance en el conocimiento molecular sobre la patología de la enfermedad celíaca, así como el conocimiento de las propiedades estructurales de las prolaminas y la mayor sensibilidad de los métodos cuantitativos disponibles en la actualidad plantean la pregunta de si es conveniente medir las prolaminas como un conjunto de proteínas o si deberían desarrollarse métodos de cuantificación altamente selectivos para un determinado péptido identificado como tóxico.

Conclusiones del Comité Científico

El problema de capital importancia que plantea el tratamiento de la enfermedad celíaca es un seguimiento correcto de una dieta sin gluten. Este seguimiento no sólo está condicionado por una buena colaboración por parte del paciente y su entorno, sino también por una valoración fiable del gluten que puede estar presente en los alimentos.

Los métodos inmunológicos son actualmente los métodos de elección para la detección de gluten en alimentos. La aplicación de otras metodologías como detección de proteínas por métodos no inmu-

nológicos (fundamentalmente espectrometría de masas) o detección de ADN de cereales alergénicos, se consideran de gran validez como métodos de confirmación.

Aunque en los últimos años han sido muchos los avances sobre los sistemas de detección de gluten en alimentos, quedan aún grandes retos por resolver sobre los que es necesario seguir trabajando. Primero, llegar a conocer la fracción tóxica, con el fin de diseñar anticuerpos específicos que sean capaces de detectar la totalidad del gluten tóxico. Segundo, profundizar en el desarrollo de sistemas de extracción que garanticen la completa extracción de gluten en todo tipo de alimentos. En tercer lugar es fundamental disponer de buenos estándares para la determinación de gliadinas y gluteninas, para conseguir homogeneidad en los resultados analíticos.

Es necesario seguir trabajando en el desarrollo de nuevas tecnologías, buscando aumentar la sensibilidad y especificidad de los métodos existentes, que permitan, de forma sencilla, rápida y económica, la detección segura y fiable del contenido de gluten en alimentos.

Referencias

- AESAN (2005). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Opinión del Comité Científico sobre el nivel de seguridad de prolaminas en alimentos sin gluten, en relación con la recidiva de pacientes celíacos. N° de Referencia: AESA-2005-010.
- Arentz-Hansen, H., Körner, R., Molberg, O., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y.M., Lundin, K.E., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L.M. y McAdam, S.N. (2000). The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *The Journal of Experimental Medicine*, 191, pp: 603-612.
- Casellas, F. (2006). Enfermedad celiaca. *Medicina Clínica*, 126, pp: 137-142.
- Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'Agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., Volta, U., Accomando, S., Picarelli, A., De Vitis, I., Pianelli, G., Gesuita, R., Carle, F., Mandolesi, A., Bearzi, I. y Fasano, A. (2007). A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, pp: 160-166.
- CODEX (2008). *Codex Alimentarius*. Codex Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Revised 2008. CODEX Stan 118-1979. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/291/cxs_118e.pdf [acceso: 16-12-2009].
- Collin, P., Thorell, L., Kaukinen, K. y Mäki, M. (2004). The safe threshold for gluten contamination in gluten-free products. Can trace amounts be accepted in the treatment of coeliac disease? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 19, pp: 1277-1283.
- Collin, P., Mäki, M. y Kaukinen, K. (2007). Safe gluten threshold for patients with celiac disease: some patients are more tolerant than others. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86, pp: 260.
- Dewar, D.H., Amato, M., Ellis, H.J., Pollock, E.L., González-Cinca, N., Wieser, H. y Ciclitira, P.J. (2006). The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 18, pp: 483-491.
- Doña, VV., Fossati, C.A. y Chirido, F.G. (2008). Interference of denaturing and reducing agents on the antigen/antibody interaction. Impact on the performance of quantitative immunoassays in gliadin analysis. *European Food Research and Technology*, 226 (3), pp: 591-602.
- Eckert, R., van Berghofer, E., Ciclitira, P.J., Chirido, F., Denery-Papini, S., Ellis, H.J., Ferranti, P., Goodwin, P., Immer, U., Mamone, G., Méndez, E., Mothes, T., Novalin, S., Osman, A., Rumbo, M., Stern, M., Thorell, L., Whim, A. y Wieser, H. (2006). Towards a new gliadin reference material— isolation and characterization. *Journal of Cereal Science*, 43, pp: 331-341.
- Fasano, A. y Catassi, C. (2001). Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology*, 120, pp: 636-651.

- García, E., Llorente, M., Hernando, A., Kieffer, R., Wieser, H. y Méndez, E. (2005). Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17, pp: 529-539.
- Green, P.H. y Cellier, C. (2007). Celiac disease. *The New England Journal of Medicine*, 357 (17), pp: 1731-1743.
- Green, P.H. y Jabri, B. (2003). Coeliac disease. *Lancet*, 362, pp: 383-391.
- Green, P.H.R., Stavropoulos, S.N., Panagi, S.G., Goldstein, S.L., McMahon, D.J., Absan, H. y Neugut, A.I. (2001). Characteristics of adult celiac disease in the USA: Results of a national survey. *American Journal of Gastroenterology*, 96, pp: 126-131.
- Hischenhuber, C., Crevel, R., Jarry, B., Mäki, M., Moneret-Vautrin, D.A., Romano, A., Troncone, R. y Ward, R. (2006). Safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 23, pp: 559-575.
- Howdle, P.D. (2006). Gliadin, glutenin or both? The search for the Holy Grail in coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 18, pp: 703-706.
- Immer, U., Gößwein, Ch. y Lauterbach, S.H. (2007). RIDASCREENÒ Gliadin competitive-new assay format for R5 antibody. 22nd Meeting Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity.
- Janatuinen, E.K., Kempainen, T.A., Julkunen, R.J., Kosma V.M., Mäki, M., Heikkinen, M. y Uusitupa, M.I. (2002). No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut. An International Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 50, pp: 332-335.
- Janssen, F.W., Klinken, F., Immer, U. y Gößwein, Ch. (2007). Safety of Asian soy sauces in gluten-free diet. 22nd Meeting Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity.
- Kagnoff, M.F. (2007). Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, pp: 41-49.
- Koning, F., Gilissen, L. y Wijmenga, C. (2005). Gluten: a two-edged sword. Immunopathogenesis of celiac disease. *Springer Seminars in Immunopathology*, 27, pp: 217-232.
- Lester, D.R. (2008). Gluten measurement and its relationship to food toxicity for celiac disease patients. *Plant Methods*, 4: 26doi:10.1186/1746-4811-4-26. Disponible en: <http://www.plantmethods.com/content/4/1/26> [acceso: 9-2-2010].
- Lundin, K.E., Nilsen, E.M., Scott, H.G., Löberg, E.M., Gjøen, A., Bratlie, J., Skar, V., Mendez, E., Løvik, A. y Kett, K. (2003). Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut. An International Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 52, pp: 1649-1652.
- Mearin, M.L. (2007). Celiac disease among children and adolescents. *Current problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 37, pp: 86-105.
- Méndez, E., Vela, C., Immer, U. y Janssen, F.W. (2005). Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17, pp: 1053-1063.
- Nassef, H.M., Bermudo Redondo, C., Ciclitira, P.J., Ellis, H.J., Fragoso, A. y O'Sullivan, C.K. (2008). Electrochemical immunosensor for detection of celiac disease Toxic Gliadin in Foodstuff. *Analytical Chemistry*, 80 (23), pp: 9265-9271.
- NIH (2005). National Institutes of Health. Statement. NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease. *Gastroenterology*, 128 (suppl 1), pp: S1-S9.
- Osborne, T.B. (1907). The proteins of the wheat kernel. *Carnegie Institution Publications*, 84, pp. 235-237.
- Peräaho, M., Kaukinen, K., Mustalahti, K., Vuolteenaho, N., Mäki, M., Laippala, P. y Collin, P. (2004). Effect of an oats-containing gluten-free diet on symptoms and quality of life in coeliac disease: a randomized study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 39, pp: 27-31.
- Polanco, A.I. Ed. (2008). Libro blanco de la enfermedad celiaca. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. Madrid, ICM.
- Rostom, A., Murray, J.A. y Kagnoff, M.F. (2006). American Gastroenterological Association (AGA). Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*, 131, pp: 1981-2002.

- Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G.M., Sollid, L.M. y Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297, pp: 2275-2279.
- Shewry, P.R. (1995). Plant storage proteins. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 70, pp: 375-426.
- Skerritt, J.H. y Hill, A. (1991). Enzyme Immunoassay for Determination of Gluten in Food: Collaborative Study. *Journal Association of Official Analytical Chemist*, 74 (2), pp: 257-264.
- Thompson, T. (2003). Oats and the gluten-free diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 103, pp: 376-379.
- UE (2009). Reglamento (CE) N° 41/2009 de la Comisión de 20 de enero de 2009 sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten. DO L 16 de 21 de enero de 2009, pp: 3-5.
- Valdés, I., García, E., Llorente, M. y Méndez, E. (2003). Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 15, pp: 465-474.

Líneas directrices de la documentación precisa para la evaluación de coadyuvantes tecnológicos que se pretenden emplear en la alimentación humana

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferri, M^o Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-004

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 19 de mayo de 2010

Grupo de Trabajo

Arturo Anadón Navarro (Coordinador)

Manuel Martín Esteban

Andreu Palou Oliver

Joaquín Berenguer Soler (CNA-AESAN)

Victorio J. Teruel Muñoz (AESAN)

Ricardo López Rodríguez (AESAN)

Introducción

El objetivo de estas líneas directrices es facilitar la presentación de los expedientes de solicitud para la autorización del uso de coadyuvantes tecnológicos en alimentación humana. Para ello, a través de estas directrices se precisa qué datos son necesarios para evaluar la seguridad del uso de los citados coadyuvantes por parte del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

Estas líneas directrices han sido adaptadas a partir de otras equivalentes de la Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Alimentos (AFSSA, 2003) y constituyen una modificación de las aprobadas por el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en su reunión plenaria de 11 de mayo de 2005. Asimismo, si fuese necesario, podrán revisarse teniendo en cuenta la evolución de los conocimientos científicos y la experiencia adquirida en este campo.

Según el Reglamento (CE) N° 1333/2008 de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios (artículo 3), se entenderá por coadyuvante tecnológico toda sustancia que no se consuma como alimento en sí misma, se utilice intencionadamente en la transformación de materias primas, alimentos o sus ingredientes para cumplir un determinado propósito tecnológico durante el tratamiento o la transformación, y pueda dar lugar a la presencia involuntaria, pero técnicamente inevitable, en el producto final de residuos de la propia sustancia o de sus derivados, a condición de que no presenten ningún riesgo para la salud y no tengan ningún efecto tecnológico en el producto final.

Este Reglamento no incluye en su ámbito de aplicación a los coadyuvantes tecnológicos. En el momento actual no se dispone de una Reglamentación horizontal que regule este tipo de productos, a la vez que no existen disposiciones comunitarias al respecto, de ahí que resulte necesario adoptar unas líneas directrices que establezcan la documentación necesaria para su evaluación por el Comité Científico de la AESAN.

Las presentes líneas directrices se aplican a los coadyuvantes tecnológicos que pueden emplearse en la fabricación de productos destinados a la alimentación humana, excluyendo de su campo de aplicación a las enzimas, biocidas y disolventes, ya reguladas de manera específica por:

- *Enzimas*: Reglamento (CE) N° 1332/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre enzimas alimentarias y por el que se modifican la Directiva 83/417/CEE del Consejo, el Reglamento (CE) N° 1493/1999 del Consejo, la Directiva 2000/13/CE, la Directiva 2001/112/CE del Consejo y el Reglamento (CE) N° 258/97.

- *Biocidas*: Directiva 98/8/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998 relativa a la comercialización de biocidas, incorporada por el Real Decreto 1054/2002, de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas.

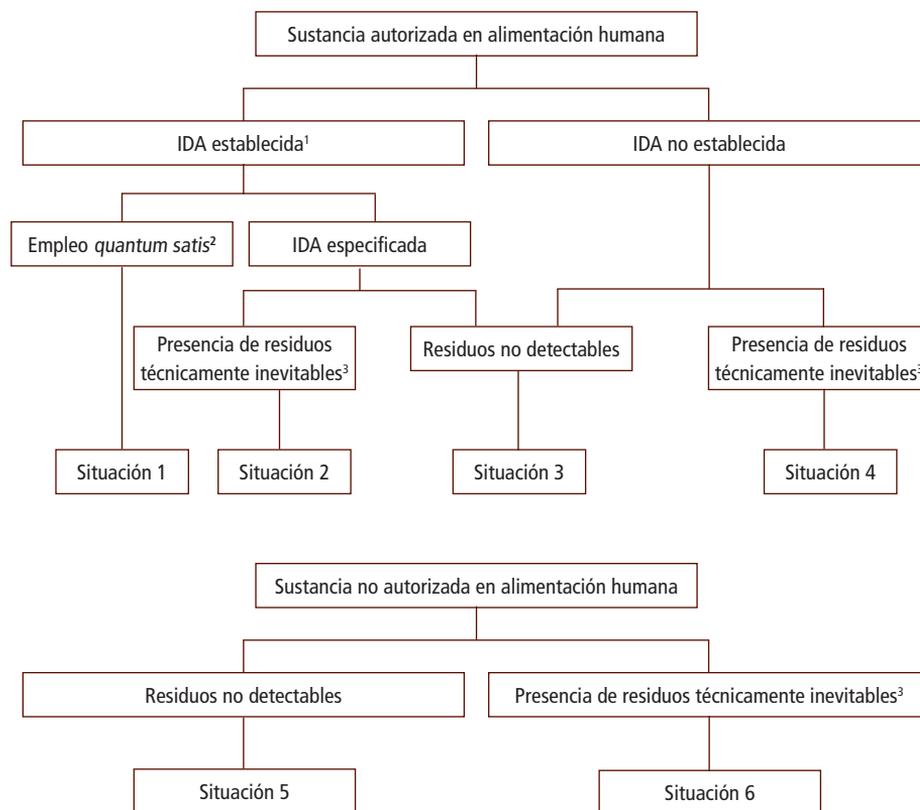
- *Disolventes*: Directiva 2009/32/CE de 23 de abril de 2009 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes, incorporada por el Real Decreto 472/1990, de 6 de abril, por el que se regulan los disolventes de extracción utilizados en la elaboración de productos alimenticios y sus ingredientes.

También se excluyen del ámbito de aplicación de estas líneas directrices los coadyuvantes tecnológicos legalmente autorizados en otros Estados miembros de la Unión Europea, con idénticas restricciones y limitaciones que allí existan, para ese mismo fin, de acuerdo con el principio de reconocimiento mutuo establecido por el Tratado Constitutivo de la Comunidad Europea; todo ello sin perjuicio de la responsabilidad que los operadores de las empresas alimentarias tienen con base en lo dispuesto en el Reglamento (CE) N° 178/2002, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria, en particular en la sección 4 sobre requisitos generales de la legislación alimentaria.

A efectos de estas líneas directrices, el término coadyuvante tecnológico se puede referir tanto a una sustancia activa como a un preparado comercial que contenga varias sustancias en proporciones conocidas.

Documentación requerida para la evaluación de un coadyuvante tecnológico

El procedimiento que se propone para la identificación de la documentación necesaria para la evaluación científica parte de un "árbol de decisión" que identifica seis situaciones para las cuales los datos requeridos se adaptan caso por caso y según el "estatus" del coadyuvante tecnológico, tal y como se establece en la Figura 1.



¹IDA= Ingesta Diaria Admisible, establecida por una institución científica reconocida (UE, *Codex Alimentarius*).

² *Quantum satis*: que no se especifica un nivel numérico máximo y las sustancias se utilizarán de conformidad con la buena práctica de fabricación, en una cantidad no superior a la necesaria para lograr el fin perseguido y a condición de que no se induzca a error al consumidor.

³ Residuos cuantificables o residuos no cuantificables pero detectables.

Figura 1. Clasificación de la situación de un coadyuvante tecnológico (árbol de decisión).

La clasificación de un coadyuvante tecnológico dentro de una de las situaciones propuestas deberá justificarse mediante los correspondientes documentos acreditativos. Los datos requeridos en el expediente de evaluación variarán en función de la situación asignada al coadyuvante tecnológico.

1. Situación 1: sustancia autorizada en alimentación humana cuyo empleo está autorizado en *quantum satis* (sin cantidad máxima establecida)

Datos requeridos en el expediente:

- Parte I. Datos administrativos y presentación general.
- Parte II. Características físico-químicas.
- Parte III. Función tecnológica.

2. Situación 2: sustancia autorizada en alimentación humana cuya IDA está especificada y cuyo empleo deriva en la presencia de residuos técnicamente inevitables

Datos requeridos en el expediente:

- Parte I. Datos administrativos y presentación general.
- Parte II. Características físico-químicas.
- Parte III. Función tecnológica.
- Parte IV. Estudios de residuos: método analítico y validación del método.
- Parte VI. Estudio de consumo y evaluación del nivel anticipado de ingesta por el consumidor.

3. Situación 3: sustancia autorizada en la alimentación humana cuya IDA está establecida o no, y cuyo empleo no origina residuos detectables

Datos requeridos en el expediente:

- Parte I. Datos administrativos y presentación general.
- Parte II. Características físico-químicas.
- Parte III. Función tecnológica.
- Parte IV. Estudios de residuos: método analítico y validación del método.

4. Situación 4: sustancia autorizada en alimentación humana cuya IDA no está establecida y cuyo empleo conduce a la presencia de residuos técnicamente inevitables

Datos requeridos en el expediente:

- Parte I. Datos administrativos y presentación general.
- Parte II. Características físico-químicas.
- Parte III. Función tecnológica.
- Parte IV. Estudios de residuos: método analítico y validación del método.
- Parte V. Estudios y datos relativos a la inocuidad: Nivel A.
- Parte VI. Estudio de consumo y evaluación del nivel anticipado de ingesta por el consumidor.

5. Situación 5: sustancia no autorizada previamente en alimentación humana cuyos residuos no son detectables

Datos requeridos en el expediente:

- Parte I. Datos administrativos y presentación general.
- Parte II. Características físico-químicas.
- Parte III. Función tecnológica.
- Parte IV. Estudios de residuos: métodos analíticos y su validación.
- Parte V. Estudios y datos relativos a la inocuidad: Nivel B.

6. Situación 6: sustancia no autorizada previamente en alimentación humana cuyo empleo conduce a la presencia de residuos técnicamente inevitables

Datos requeridos en el expediente:

- Parte I. Datos administrativos y presentación general.

- Parte II. Características físico-químicas.
- Parte III. Función tecnológica.
- Parte IV. Estudios de residuos: métodos analíticos y su validación.
- Parte V. Estudios y datos relativos a la inocuidad: Nivel C.
- Parte VI. Estudio de consumo y evaluación del nivel anticipado de ingesta por el consumidor.

Los expedientes de solicitud deben aportar información relativa a la totalidad de las partes y apartados enunciados, cuyo contenido se detalla en el Anexo I de estas directrices. Dicha información ha de estar refrendada con datos experimentales y debe adaptarse a la evolución tecnológica y a la de los conocimientos científicos. Sin embargo, este procedimiento general puede adaptarse a las situaciones particulares de ciertos coadyuvantes tecnológicos.

Asimismo, las solicitudes deberán contener un breve resumen del expediente, incluyendo una descripción de los estudios presentados, así como una conclusión general acerca del conjunto de los datos disponibles.

En el caso de que una solicitud no se pueda ajustar a las exigencias de las presentes líneas directrices, sobre todo cuando no resulte científicamente justificado o técnicamente posible presentar la información, se deberá remitir una justificación de tal circunstancia, estando sujeta su aceptación al criterio que adopte el Comité Científico de la AESAN.

Durante la evaluación de un expediente en particular, el Comité Científico de la AESAN podrá estimar que, para la evaluación del coadyuvante tecnológico, son necesarios datos o estudios complementarios, no previstos por estas líneas directrices.

La información facilitada por los solicitantes que constituya secreto industrial o comercial será tratada de modo confidencial, si así lo pidiera el solicitante y si se acepta la justificación de tal petición por la AESAN.

En ninguna circunstancia se considerará confidencial lo siguiente:

- Datos administrativos.
- Denominación precisa y comercial de la sustancia o sustancias activas objeto de evaluación, así como las características físico-químicas (excluido el proceso de obtención de las mismas).
- Uso tecnológico alegado, niveles previstos y los alimentos o grupos de alimentos de destino.
- Nivel de residuos en el caso de que existan.
- Métodos analíticos utilizados.
- Todos los datos que presenten un interés para la determinación de la seguridad de la sustancia.

A efectos de la aplicación de la confidencialidad, el solicitante indicará, entre los datos comunicados, los que desee que se traten de manera confidencial.

Anexo I. Descripción de las diferentes partes de un expediente

Parte I. Datos administrativos y presentación general

- Nombre o razón social y dirección del solicitante y de la persona responsable del expediente.
- Nombre o razón social y dirección del fabricante del coadyuvante tecnológico, identificación de los centros implicados en las diversas fases de la producción.

- Designación precisa y denominación comercial de las sustancias.
- Uso previsto para las sustancias.
- Usos autorizados en alimentación humana.
- Fuentes y referencias de las instituciones científicas que hayan establecido la Ingesta Diaria Admisibles (IDA) de cada sustancia presente en el coadyuvante tecnológico.
- Resumen del expediente y listado de los documentos adjuntos.

Parte II. Características físico-químicas

II. 1 Composición y formulación detallada del producto propuesto como coadyuvante tecnológico

- Nombres de las sustancias presentes en el coadyuvante tecnológico: nombre de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), nombre común, nombre comercial, sinónimos, denominaciones abreviadas y número CAS (*Chemical Abstracts Service*) (si se dispone).

II. 2 Especificaciones del producto

En general serán las siguientes:

- Número CAS, peso molecular (g/mol) y fórmula empírica y desarrollada de cada sustancia presente en el producto.
- Estado físico (líquido, polvo...).
- Pureza (%), precisando el método analítico para determinarla. Los métodos de análisis deben estar validados mediante criterios internacionalmente reconocidos, con la garantía de calidad suficiente (por ejemplo: según requisitos de la norma ISO 17025).
- Identificación y límite de impurezas presentes. Los métodos de análisis deben estar validados mediante criterios internacionalmente reconocidos, con la garantía de calidad suficiente (por ejemplo: según requisitos de la norma ISO 17025).
- Solubilidad en solventes acuosos y orgánicos y en el alimento con el que va a contactar.
- pH en solución para una concentración de un 1% del producto.
- Estabilidad a la temperatura de elaboración del alimento y durante el almacenamiento del mismo (precisando en qué condiciones ocurre una degradación de la misma).
- Reactividad respecto al entorno de contacto (precisando la naturaleza de las reacciones que acaecen, los productos de reacción obtenidos y las posibles reacciones secundarias).
- Cuando proceda, información sobre las características microbiológicas, en especial sobre la posible presencia de agentes patógenos, toxinas bacterianas o micotoxinas.
- Otros datos que el solicitante considere útiles para la caracterización del producto (por ejemplo: otras propiedades físicas o químicas).

II. 3 Proceso de obtención de las sustancias

El solicitante suministrará la información necesaria respecto al método de fabricación de las sustancias, en especial sobre la secuencia de reacción, las reacciones colaterales, la purificación y la preparación del producto comercializado.

Parte III. Función tecnológica

Puede referirse tanto a una sustancia activa como a un preparado comercial que contenga varias sustancias en proporciones conocidas, declaradas como coadyuvante tecnológico. En ese caso, se presentarán los datos tecnológicos sobre el preparado comercial que contiene varias sustancias, y se deberán proporcionar los datos analíticos y toxicológicos para cada una de las sustancias que constituyen el preparado.

III. 1 Uso tecnológico alegado

III. 2 Alimento o grupo de alimentos de destino

III. 3 Relación de usos ya autorizados de la sustancia o sustancias en alimentación humana

La relación de usos autorizados en otros países deberá ir acompañada de los correspondientes documentos acreditativos.

III. 4 Descripción detallada del proceso para el cual se prevé el uso del coadyuvante tecnológico

- 1) Formas de incorporación del coadyuvante tecnológico en el proceso:
 - Fase de transformación en la que el coadyuvante tecnológico se incorpora al alimento.
 - Forma bajo la que el coadyuvante tecnológico se incorpora.
 - Métodos de control de las cantidades incorporadas al alimento.
- 2) Identificación de las fases de eliminación del coadyuvante tecnológico y de sus componentes durante el proceso de transformación del alimento:
 - Eliminación espontánea (por degradación, evaporación, separación física, etc.) o
 - Eliminación intencionada mediante un proceso a especificar.

En el caso de que el uso del coadyuvante tecnológico de lugar a la presencia de residuos técnicamente inevitables en el alimento, deberá justificarse adecuadamente los motivos (por ejemplo: tecnológicos entre otros) que impiden la eliminación del coadyuvante tecnológico o de sus componentes durante el proceso de transformación del alimento.

- 3) Justificación del uso, interés y eficacia del coadyuvante tecnológico. Explicación del papel tecnológico del coadyuvante tecnológico en el proceso de transformación. Interés con respecto a otros coadyuvantes tecnológicos ya autorizados.

III. 5 Informes de ensayos que permitan proponer el nivel de uso previsto o el nivel máximo de empleo en:

- 1) Condiciones de laboratorio (sobre cantidades pequeñas, en proceso discontinuo) y/o en condiciones piloto; o bien
- 2) Condiciones industriales en caso de que el coadyuvante tecnológico ya se utilice en otro país, o en caso de que se haya obtenido una autorización para su ensayo a nivel industrial.

Se entiende como "condiciones piloto" a la simulación a escala reducida de un proceso industrial, imitando las condiciones tecnológicas lo más fielmente posible respecto a dicho proceso. Además, si el proceso industrial al que está destinado el coadyuvante tecnológico es continuo, las pruebas en

condiciones piloto deberán realizarse de forma continua durante un tiempo suficientemente largo para la evaluación del impacto del uso del coadyuvante tecnológico en el alimento y el proceso en sí.

Los alimentos obtenidos en condiciones de laboratorio o en condiciones piloto no se destinarán al consumo.

En algunos casos en particular no es posible realizar ensayos en condiciones piloto. El solicitante puede proponer la instrucción del expediente en dos etapas:

- 1) Etapa de preparación. Elaboración de un expediente lo suficientemente documentado respecto a las exigencias expuestas en estas líneas directrices, que incluya los resultados de los ensayos en condiciones de laboratorio. Ese expediente permitirá al solicitante pedir una autorización para realizar un ensayo en condiciones industriales. Deberá indicarse en el expediente si se prevé que los alimentos producidos durante este ensayo industrial podrán destinarse al consumo.
- 2) Instrucción final. Preparación de un expediente completo conforme a las presentes líneas directrices que incluya los resultados del ensayo industrial.

Los ensayos deberán permitir determinar:

- La eficacia del coadyuvante tecnológico para el uso propuesto.
- La eficacia del proceso de eliminación del coadyuvante tecnológico después de haber actuado.
- En caso de no precisarse ningún proceso de eliminación, se deberá demostrar que el coadyuvante no tiene una función tecnológica en el producto final.
- El nivel previsto, necesario y suficiente, para obtener el efecto buscado, en condiciones de laboratorio o en condiciones de pruebas piloto y una propuesta de un nivel máximo de empleo.
- El nivel de residuos técnicamente inevitable para el nivel previsto.

Los ensayos en condiciones de laboratorio, piloto, o industrial, deben incluir un ensayo "testigo", que no contenga el coadyuvante tecnológico en cuestión, para la toma de muestras de referencia con fines de análisis.

Los ensayos a dosis variables deben, además, incluir tomas de muestras suficientes, en número y cantidad, para permitir la realización de un tratamiento estadístico satisfactorio de los resultados.

Los resultados pueden mencionar eventuales ensayos comparativos entre el coadyuvante tecnológico estudiado y otras sustancias (autorizadas para este uso y en este alimento o en otros) o ensayos realizados con este producto en el marco de una solicitud relativa a otras aplicaciones o procesos.

III. 6 El resto de consecuencias directas o indirectas que para las características del alimento se derivan del uso del coadyuvante tecnológico

Parte IV. Estudios de residuos: método analítico y validación del método

El conjunto de estudios de puesta a punto y de validación del método, así como su correspondiente informe, se realizarán de acuerdo con requisitos de Garantía de Calidad.

Se propondrá el método analítico utilizado para la identificación y la cuantificación de los residuos de los coadyuvantes tecnológicos. Los residuos pueden estar formados por el compuesto inalterado, productos de degradación o de reacción con la matriz.

El método de análisis debe estar validado mediante criterios internacionalmente reconocidos, con la garantía de calidad suficiente (por ejemplo: según requisitos de la norma ISO 17025).

En caso de que el método utilizado se hubiera publicado como Norma (“método normalizado”), y que se use sin modificación, dentro de su ámbito de aplicación previsto y en la matriz para la que fue validado, no se necesitará realizar una nueva descripción (punto IV.1) ni una nueva validación del método (punto IV.2). Sin embargo, se proporcionará, como anexo al informe final, la documentación relativa a dicho método, incluyendo información y datos sobre la validación realizada para su normalización (punto IV.2).

IV.1 Descripción del método

Se efectuará una descripción detallada utilizando las terminologías internacionales habituales. Se documentarán la toma y la preparación de muestras.

Deberá cuidarse, en particular, el plan de muestreo (número de réplicas, etc.) para permitir, *a posteriori*, un tratamiento estadístico de los resultados. Se precisará también el proceso de extracción.

El método puede ser presentado de modo operacional normalizado o en forma equivalente (por ejemplo: formato ISO 78/82).

IV.2 Validación del método: resultados y criterios

Según establece, por ejemplo, la Norma ISO 17025, “la validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”. En este sentido, el esquema de validación de un método debe incluir: 1) La especificación de los requisitos; 2) La determinación de las características del método; 3) La verificación de que los requisitos pueden satisfacerse utilizando el método; y 4) Una declaración sobre la validez del método.

Así pues, la validación debe poner de manifiesto las aptitudes del método analítico para cuantificar e identificar las trazas de los coadyuvantes tecnológicos en cada tipo de matriz (producto final comercializado) que se solicite.

Se estudiarán los siguientes parámetros:

- Especificidad/Selectividad.
- Exactitud.
- Precisión (repetibilidad y reproducibilidad).
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.
- Intervalo de cuantificación (rango de trabajo).

Debe tenerse en cuenta la estabilidad del analito en las muestras, así como en la solución de trabajo y los patrones. Si el almacenamiento de las muestras lo requiriera, se puede suministrar un estudio acerca de las condiciones de conservación en estado de congelación de las muestras así como sobre el efecto de los ciclos congelación/descongelación.

En caso de utilizarse un método analítico cualitativo, los criterios de validación deben definirse *a priori* según textos de referencia existentes o basados en consideraciones justificadas. En principio, los parámetros de validación deberían incluir al menos: especificidad, selectividad, límite de detección y aplicabilidad.

IV. 3 Informe final

Se deberá suministrar un informe final del método. Para cada matriz estudiada, el informe final fechado y firmado deberá incluir lo siguiente:

- Descripción del método.
- Validación.
- Cromatogramas, espectrogramas, etc.
- Informes de los estudios intermedios.
- Cálculos y análisis estadísticos.
- Análisis crítico de los resultados.

Parte V. Inocuidad

V. 1 Principios generales

V. 1.1 Definición de los niveles de exigencia

La condición de la sustancia permite distinguir entre tres niveles de exigencia:

- **Nivel A:** Sustancia ya utilizada en alimentación humana, cuya IDA no ha sido establecida por una institución reguladora reconocida y cuyo uso conduce a residuos técnicamente inevitables.
- **Nivel B:** Sustancia no utilizada previamente en alimentación humana y que no da lugar a residuos detectables.
- **Nivel C:** Sustancia no utilizada previamente en alimentación humana y cuyo uso ocasiona residuos técnicamente inevitables.

V. 1.2 Estudios toxicológicos

Casos generales

A la hora de evaluar el riesgo para el consumidor, es necesario disponer de datos toxicológicos experimentales o bibliográficos en animales de laboratorio y/o datos en humanos tanto para la sustancia activa propuesta como del coadyuvante tecnológico y sus metabolitos, así como para los productos resultantes de su degradación o de su reacción con las matrices.

Los estudios toxicológicos deben realizarse según las recomendaciones de las líneas directrices de la OCDE (o equivalente). En caso de no ser así, deberá suministrarse una justificación razonada.

Asimismo, en caso de que un estudio requerido no se haya realizado, deberán justificarse científicamente las razones para ello.

Deberá presentarse un estudio crítico de la parte toxicológica del expediente, procedente de estudios de una investigación experimental o bibliográfica.

Los informes y los estudios deberán realizarse bajo garantías de calidad y siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

Casos particulares

En el caso de los coadyuvantes tecnológicos para los cuales los estudios toxicológicos habituales no se pueden llevar a cabo, ya sea debido a la inestabilidad de las sustancias químicas, o por causa de la naturaleza misma del coadyuvante tecnológico, se puede obtener información acerca de su inocuidad a partir del producto final, que haya sido preparado usando este coadyuvante tecnológico, en las condiciones de uso previstas.

V. 2 Contenido del expediente toxicológico

Deberán suministrarse los estudios indicados en la Tabla 1.

Tabla 1. Estudios a incluir en el expediente toxicológico		
Estudios		
Nivel A	Toxicocinética	Se deberá informar sobre la absorción, distribución tisular, metabolismo y excreción de los residuos. La información podrá proceder de documentación bibliográfica o de estudios realizados en animales de laboratorio y/o en el hombre. En caso de estudios de metabolismo, se pueden realizar también estudios <i>in vitro</i> .
	Toxicología	Una investigación bibliográfica deberá permitir la evaluación de la inocuidad de los residuos. En caso de no haber datos bibliográficos disponibles, el solicitante deberá confeccionar un expediente de nivel B.
	Reacciones alérgicas o de intolerancia	–
Nivel B	Toxicocinética	Igual que para el Nivel A.
	Toxicología	Los estudios deberán permitir una evaluación de la inocuidad del coadyuvante tecnológico y de los posibles metabolitos y productos de degradación o de reacción con las matrices. Estudio de toxicidad oral a dosis repetidas durante 28 días en roedores (preferiblemente pre-púberes) según las líneas directrices OCDE 407 (o equivalente) o cualquier estudio publicado, realizado según las exigencias científicas más recientes, que permita evaluar la inocuidad del coadyuvante tecnológico (metabolitos, productos de degradación o de la reacción con las matrices) y determinar un nivel de dosis sin efecto adverso observable (NOAEL). Estudios de toxicología genética. Se requieren dos ensayos <i>in vitro</i> [un ensayo de mutación reversa en bacterias (OCDE 471 y/o 472) y un ensayo de mutación génica en células de mamíferos (linfoma de ratón L5178Y; OCDE 476)], así como un ensayo <i>in vivo</i> de mutación cromosómica [ensayo de micronúcleo en eritrocitos de mamíferos (OCDE 474)]. Los siguientes estudios complementarios deberán proporcionarse según sea pertinente: Carcinogénesis. Para toda sustancia que presente una analogía en su estructura química con un agente cancerígeno conocido o que haya provocado manifestaciones y/o lesiones sospechosas durante el estudio de toxicidad por administración repetida. Toxicidad para la reproducción y el desarrollo. El solicitante debe considerar la necesidad de realizar estudios específicos o de discutir los posibles efectos observados en las funciones de reproducción durante el estudio de toxicidad por administración repetida. Inmunotoxicidad. El solicitante debe considerar la necesidad de realizar estudios complementarios relativos a los efectos de la sustancia en el sistema inmunitario.

	Reacciones alérgicas o de intolerancia	<p>Actualmente no existe un método de experimentación animal reconocido que permita evaluar la capacidad de una sustancia química para provocar reacciones alérgicas o de intolerancia en sujetos sensibles tras una exposición oral. Deberá suministrarse toda la información disponible que permita evaluar el riesgo de alergia o de intolerancia alimentaria ligado al coadyuvante tecnológico, si no hay seguridad de su eliminación completa.</p> <p>Es difícil en el caso de coadyuvantes de bajo peso molecular, ya que, como ocurre con los fármacos, no existe relación entre la estructura química y el riesgo de sensibilización, si bien este riesgo es bajo. En cambio, todos los coadyuvantes con estructura proteica son potencialmente alérgicos, por lo que es recomendable evaluar este potencial, considerando su analogía con alérgenos conocidos y su reactividad con sueros de alérgicos a alimentos de la misma naturaleza; igualmente, es un índice orientativo la persistencia de la alergenidad tras la digestión péptica (presencia de alérgenos estructurales o secuenciales) o tras el proceso tecnológico (por ejemplo, un estudio de analogías entre su estructura y un alérgeno conocido).</p>
Nivel C	Toxicocinética	Igual que para el Nivel A.
	Toxicología	<p>Los estudios deberán permitir una evaluación de la inocuidad del coadyuvante tecnológico y de los posibles metabolitos y productos de degradación o de reacción con las matrices.</p> <p>Estudio de toxicidad subcrónica durante 90 días. Este estudio deberá realizarse al menos en una especie animal que pertenezca al orden de los roedores, según las directrices OCDE 408 (o equivalentes). O bien, se podrá suministrar un estudio publicado, realizado según las exigencias científicas más recientes, que permita evaluar la inocuidad del coadyuvante tecnológico (metabolitos, productos de degradación o de reacción con las matrices) y determinar un nivel dosis sin efecto adverso observable (NOAEL).</p> <p>Estudio de toxicidad para la reproducción (incluida la teratogénesis). Se debe suministrar un estudio de toxicidad para la reproducción en una generación (OCDE 415 o equivalente). No obstante, si existen en la literatura estudios sobre cada uno de los tres segmentos (fertilidad y capacidad reproductiva general, toxicidad embrio-fetal y teratogénesis, toxicidad peri- y post- natal), el solicitante puede presentarlos en su expediente sustituyendo al estudio de reproducción en una generación.</p> <p>Los siguientes estudios complementarios deberán proporcionarse según sea pertinente:</p> <p>Carcinogénesis. Igual que para el Nivel B.</p> <p>Inmunotoxicidad. Igual que para el Nivel B.</p>
	Reacciones alérgicas o de intolerancia	Igual que para el Nivel B.

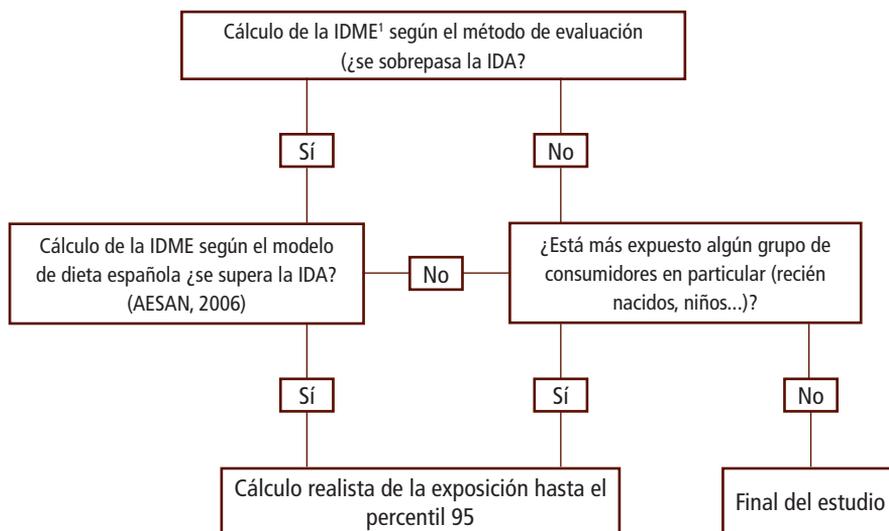
Parte VI. Estudio de consumo y evaluación del nivel de exposición del consumidor

El estudio de consumo se necesita en los casos en los que el coadyuvante tecnológico esté presente en forma de residuo en el alimento. Este caso se corresponde con las situaciones tipo 2, 4 ó 6.

VI. 1 Proceso de evaluación del nivel de exposición

Si no se ha establecido una IDA (situaciones de tipo 4 ó 6), el solicitante proporcionará los datos de consumo a partir de los datos de producción del coadyuvante tecnológico disponibles o a partir de los datos de consumo de alimentos que pudieran contener residuos del coadyuvante tecnológico.

Si se ha asignado y especificado una IDA (situación de tipo 2), el solicitante realizará una estimación del nivel de exposición de los consumidores siguiendo el método que se resume en el siguiente "árbol de decisión" (Figura 2):



¹Ingesta Diaria Máxima Estimada.

Figura 2. Estimación del nivel anticipado de la ingestión (árbol de decisión).

VI. 2 Métodos de cálculo

A continuación se describen las modalidades prácticas de los tres métodos de cálculo que se usarán (método de evaluación, método de cálculo de las IDME según el modelo de dieta española y cálculo de la exposición hasta el percentil 95).

VI. 2.1 Método de evaluación de la ingesta diaria máxima

El método de evaluación, utilizado en primera instancia a nivel europeo para los aditivos alimentarios, permite estimar la ingesta diaria máxima estimada (IDME) (en microgramos de residuo ingerido con alimentos o bebidas por cada kilogramo de peso corporal) (Hallas-Moller, 1995).

- Este cálculo se basa en la hipótesis de un consumo máximo diario de alimentos sólidos de 25 gramos por kilogramo de peso corporal, de los cuales sólo una cuarta parte podría contener residuos del coadyuvante tecnológico, es decir 1/160 de kg de alimento por kg de peso corporal (podrían contener residuos la mitad de los productos de primera transformación como las aves, carnes, pescados, productos lácteos o cereales, es decir 1/80 de kg de alimento por kg de peso corporal).

- Para los alimentos líquidos distintos a la leche, el consumo máximo es de 100 ml por kilogramo de peso corporal, de los cuales sólo una cuarta parte podría contener aditivos. Esto representa 1/40 de litro de bebida por kilogramo de peso corporal.

El procedimiento para el cálculo de la IDME según este método de evaluación se esquematiza en la Tabla 2.

El carácter protector de este método para la estimación de los niveles de exposición a lo largo de toda la vida ha sido validado para la población general.

Tabla 2. Etapas para el cálculo de la ingesta mediante el método de evaluación			
Etapas de cálculo	Alimentos líquidos	Alimentos sólidos	Alimentos sólidos de primera transformación
Consumo máximo alimento por Kg p.c. ¹	100 ml=1/10 l	25 g=1/40 Kg	25 g=1/40 Kg
Corrección por contenido de coadyuvante en los alimentos	Sólo 1/4 parte lo contienen	Sólo 1/4 parte lo contienen	Sólo 1/2 (la mitad) lo contienen
Cantidad máxima de alimentos ingeridos (por Kg p.c.) que contienen el coadyuvante	1/10 x 1/4=1/40 l	1/40 x 1/4=1/160 kg	1/40 x 1/2=1/80
IDME µg/kg p.c.	=N.R. ² en µg/l x 1/40	=N.R. ² en µg/kg x 1/60	=N.R. ² en µg/kg x 1/80

IDME total=IDME alimentos líquidos + IDME alimentos sólidos.

¹p.c.=peso corporal; ²N.R.=nivel de residuos.

VI. 2.2 Método de cálculo de la IDME según el modelo de dieta española o equivalente (AESAN, 2006)

El cálculo de exposición consiste en sumar los consumos de los grupos de alimentos vectores del residuo del coadyuvante tecnológico estudiado multiplicados por los valores máximos de residuos en los alimentos para dicho coadyuvante tecnológico. El resultado de ese cálculo es una Ingesta Diaria Máxima Estimada (IDME) expresada en nivel de residuo por kg de peso corporal por día. En esta etapa se utiliza un peso corporal medio de 60 kg para un adulto.

VI. 2.3 Método de cálculo realista del nivel anticipado de la ingesta al percentil 95

Esta estimación del nivel anticipado de la ingesta se realiza a partir de encuestas individuales de consumo de la población general (del mismo tipo que el estudio INCA (Volatier, 2000) o de los grupos de población con más exposición (niños...). Se tendrán en cuenta los consumos más elevados de alimentos vectores (percentil 95) y los valores medidos en el alimento relativos al residuo del coadyuvante tecnológico estudiado. El resultado de este cálculo se relaciona con el peso corporal de la población objeto del estudio y se compara con la IDA.

Referencias

- AESAN (2006). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Modelo de dieta española para la determinación de la exposición del consumidor a sustancias químicas. Disponible en: http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/modelo_dieta_espanola.pdf [acceso: 30-4-2010].
- AFSSA (2003). Agence Francaise de Securite Sanitaire des Aliments. Lignes directrices pour la constitution d'un dossier relatif a l'emploi d'un auxiliaire technologique en alimentation humaine.
- Hallas-Moller, T. (1995). Using the budget method as a quick screening method identifying food additives for which further monitoring is not warranted on health grounds. Draft report for the SCF, 1st June.
- Volatier, J.L. (2000). Enquête Individuelle et Nationale sur les Consommations Alimentaires. Ediction TEC &DOC Lavosier.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el riesgo asociado a la presencia de ácidos grasos *trans* en alimentos

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferrí, M^a Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-005

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 19 de mayo de 2010

Grupo de Trabajo

Manuela Juárez Iglesias (Coordinadora)
Arturo Anadón Navarro
Alberto Cepeda Sáez
Rosaura Farré Rovira
Andréu Palou Oliver
M^a Carmen Vidal Carou
Concepción Becerril Moral (AESAN)

Resumen

Las recomendaciones nutricionales incluyen la disminución de la ingesta de los ácidos grasos saturados y ácidos grasos *trans* (AGt) ya que existe suficiente evidencia de su relación con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. No existe consenso en la definición de AGt. La Organización Mundial de la Salud (OMS) excluye a los isómeros del ácido linoleico conjugado de la definición de AGt mientras que algunos países y/o agencias los suelen incluir. Los AGt se pueden producir de forma natural y pueden formarse por hidrogenación catalítica de los aceites vegetales (AGtHC). La hidrogenación permite obtener grasas semisólidas de interés tecnológico para la elaboración de distintos alimentos, pero los AGt también se encuentran de forma natural en la carne y la leche procedentes de los rumiantes. Actualmente se admite que los efectos adversos debidos a la ingesta de AGt se inician mediante cambios en el perfil de las lipoproteínas séricas, aunque también se pueden afectar la respuesta inflamatoria y la función endotelial. No se ha llegado a conclusiones definitivas respecto a la concentración umbral de AGt por encima de la cual se producen efectos adversos. El riesgo asociado al consumo de AGt depende de los alimentos que forman la dieta, de su contenido en AGt y principalmente, de la cantidad consumida por el individuo o la población. La Comisión Europea financió en 1995 el proyecto "TRANSFAIR study: Intake of trans fatty acids in Western Europe with emphasis on *trans* fatty acids" cuyo objetivo fue valorar el consumo de AGt en 14 países europeos. Los valores medios variaron entre los diferentes países (1,5 a 5,4 g/día) y el estudio concluía que en general el consumo de AGt en Europa no era preocupante. En España la ingesta de AGt se situó entonces en 2,1 g/día. También se constataron las diferencias en el contenido de AGt incluso en un mismo tipo de alimento, debidas fundamentalmente al proceso industrial, pero también variaba dependiendo del método analítico utilizado. En los últimos años, el contenido de AGt en los alimentos en Europa ha disminuido, debido a las modificaciones realizadas en los procesos tecnológicos de hidrogenación de aceites y a las recomendaciones hechas por los diferentes organismos

competentes. En nuestro país en estudios recientes realizados por el Centro Nacional de Alimentación perteneciente a la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, en los que se determinó el perfil de ácidos grasos de productos de bollería, cereales, aperitivos, patatas fritas, galletas, chocolates, cremas de cacao, margarinas, paté y embutidos entre otros, se detectaron contenidos de AGt en general inferiores al 1% del total de ácidos grasos, en línea con la disminución de los contenidos de AGtHC de las grasas hidrogenadas documentado en otros países. En productos analizados de origen animal como mantequilla y preparados con carne de rumiantes, los contenidos en AGt oscilaron entre el 2-3% del total de ácidos grasos. No obstante, ahora está bien establecido que la ingesta de AGtHC se asocia a un incremento de riesgos cardiovasculares, pero ese efecto no está demostrado en AGt de origen natural. En base a datos de la dieta española y los contenidos de AGt actuales en alimentos se puede señalar que las ingestas estimadas de AGtHC son inferiores a las mencionadas en el proyecto europeo TRANSFAIR.

La Organización Mundial de la Salud recomienda que el consumo de AGt no supere el 1% de la ingesta energética total, la *Food and Drug Administration* (FDA) recomienda una ingesta en AGt tan baja como sea posible y en Europa algunos países como los nórdicos han dado sus propias normas y recomendaciones (un máximo de 2% de AGtHC en aceites y alimentos procesados).

Palabras clave

Alimentos, grasas, ácidos grasos *trans*, riesgo cardiovascular, recomendaciones de ingesta.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the risk associated with the presence of *trans* fatty acids in foodstuffs.

Abstract

Nutritional recommendations include a reduction in the intake of saturated fatty acids and *trans* fatty acids (TFA) as there is sufficient evidence of their relationship with the development of cardiovascular disease. There is not yet any consensus on the definition of TFA. The World Health Organization excludes isomers of conjugated linoleic acid from the definition of TFA whereas some countries and/or agencies usually include them. TFA may occur naturally and can be formed by the catalytic hydrogenation of vegetable oils (CH TFA). Hydrogenation allows semi-solid fats of technological interest to be obtained for the production of various foodstuffs, but TFA are also found naturally in meat and in milk from ruminant animals.

It is currently accepted that the adverse effects due to the intake of TFA begin with changes in the profile of serum lipoproteins, although the inflammatory response and the endothelial functions may also be affected. No definitive conclusions have been reached with respect to the threshold concentration of TFA above which adverse effects occur. The risk associated with the consumption of TFA depends on the foods contained in the diet, their TFA content and, mainly, the amount consumed by the individual or the population.

In 1995, the European Commission funded the project for the "TRANSFAIR study: Intake of fatty acids in Western Europe with emphasis on TFA" with the aim of assessing the consumption of TFA in

14 European countries. The mean values varied between the different countries (1.5 to 5.4 g/day) and the study concluded that, in general, the consumption of TFA in Europe was not a cause for concern.

In Spain, the intake of TFA was then set at 2.1 g/day. Differences in TFA content were also confirmed even in a single food type, basically due to the industrial process, but also varied depending on the analytical method used. In recent years, the TFA content in foods in Europe has come down, due to modifications in the technological processes for the hydrogenation of oils and the recommendations made by the various competent bodies. Recent studies in our country by the National Food Centre of the Spanish Food Safety Authority to determine the profile of fatty acids in industrial bakery products, cereals, pickles, crisps, biscuits, chocolates, cocoa creams, margarines, pate and stuffed sausages, among others, detected TFA contents generally lower than 1% of the total of fatty acids, in line with the reduction in CH TFA contents in hydrogenated fats as documented in other countries. In products of animal origin analyzed, such as butter and meals prepared with the meat of ruminants, the TFA contents varied between 2% and 3% of the total of fatty acids. Nonetheless, it has now been well established that the intake of CH TFA is associated with an increase in cardiovascular risks, but this effect has not been demonstrated in TFA of natural origin. On the basis of data about Spanish diet and the current TFA contents in food, it can be said that the estimated intakes of CH TFA are lower than those mentioned in the European TRANSFAIR project.

The World Health Organization recommends that consumption of TFA should not exceed 1% of the total energy intake; the Food and Drug Administration recommends the lowest possible intake of TFA; and in Europe, some countries in Scandinavia have established their own rules and recommendations (a maximum of 2% of CH TFA in oils and processed foods).

Key words

Food, fats, *trans* fatty acids, cardiovascular risk, intake recommendations.

Introducción

El papel de las grasas y aceites en la nutrición humana es una de las áreas de interés e investigación en el campo de la ciencia de la nutrición. Los resultados de estas investigaciones tienen consecuencias de amplio alcance para los consumidores, para los responsables de la salud y educadores nutricionales, así como para los productores, elaboradores y distribuidores de alimentos.

En la literatura científica, surgen constantemente pruebas nuevas relacionadas con los beneficios y riesgos asociados a determinados aspectos del consumo de grasas de la alimentación. Los objetivos formulados por la OMS y la FAO (*Food and Agriculture Organization*) relativos a la ingesta de nutrientes para la prevención de enfermedades crónicas relacionadas con la dieta proponen que la contribución de la grasa al aporte energético total debe estar comprendida entre el 15 y el 30%, la correspondiente a los ácidos grasos saturados (AGS) inferior al 10%, los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de un 6 a un 10% y el resto en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) (OMS, 2003).

El contenido en AGS de la grasa de leche es alto (~65%). No obstante, en base a la información científica disponible, se puede indicar que solo un tercio de los ácidos grasos presentes en la leche, correspondiente a la concentración de los AGS C12, C14 y C16, podrían considerarse desfavorables, si se produce un consumo excesivo (Legrand, 2008).

Los programas nutricionales desarrollados en las últimas décadas han hecho especial hincapié en la disminución de la ingesta de algunos tipos de ácidos grasos ya que existe suficiente evidencia científica de su relación con el desarrollo de diferentes enfermedades degenerativas (OMS, 1990). En este sentido los ácidos grasos *trans* (AGt) presentes en algunos alimentos, son objeto de gran preocupación e interés científico (Uauy et al., 2009).

1. Generalidades de los ácidos grasos. Nomenclatura e isomería

Los ácidos grasos (AG) constituyen la fuente más importante de lípidos en nuestra dieta. En la naturaleza se encuentran principalmente unidos al glicerol formando triglicéridos. Constan de una cadena alquílica con un grupo carboxílico terminal y los más abundantes presentan cadenas lineales con un número par de átomos de carbono. La longitud de la cadena de los AG varía ampliamente, desde 4 a 30 átomos de carbono presentes en algunos aceites de pescado. Sin embargo, los mayoritarios son los de 18 átomos de carbono.

En función de las uniones entre los átomos de carbono, los AG pueden ser saturados o insaturados y estos a su vez, según tengan uno o más dobles enlaces, en monoinsaturados o poliinsaturados.

Existen diferentes formas de denominar los AG insaturados.

- Nomenclatura normalizada de química orgánica. Los AG se denominan a partir del radical alquilo correspondiente, la estructura de la cadena carbonada (naturaleza de los enlaces, número, posición y configuración de los dobles o triples enlaces, si los hubiera) y la naturaleza de la función (ácido). Así el ácido 9-*cis*, 12-*cis* octadecadienoico, es un ácido (terminación -oico) de 18 átomos de carbono (octadeca) con 2 (di) dobles enlaces (eno) en los carbonos 9 y 12, a contar a partir del grupo carboxilo (ácido) y de configuración geométrica *cis*.
- El nombre común. Es el que designa a menudo los principales AG según criterios arbitrarios. Así, el ácido 9-*cis*, 12-*cis* octadecadienoico es conocido comúnmente como ácido linoleico.

- De forma abreviada se puede designar a un ácido graso por su número de carbonos, el número de dobles enlaces y la posición y la geometría de dichos enlaces. Así el ácido 9-*cis*, 12-*cis* octadecadienoico se puede denominar $\Delta 9_{cis}$, $\Delta 12_{cis}$ 18:2 o más a menudo 9c, 12c 18:2. Existe una variante de esta nomenclatura que consiste en numerar los átomos de carbono a partir del metilo terminal en lugar del carboxilo. El ácido linoleico se convierte en 18:2 n-6, lugar donde se encuentra el doble enlace contado a partir del metilo terminal. A veces se encuentra la nomenclatura antigua utilizando la "ω". Esta nomenclatura hace resaltar la noción de "familia" de AG n-6 (ω6) y n-3 (ω3), refiriéndose respectivamente al ácido linoleico y al ácido linolénico (o ácido 9*cis*, 12*cis*, 15*cis* octadecatrienoico, abreviado como 9c, 12c, 15c 18:3 o 18:3 n-3 (ω3)).

Los AG insaturados presentan dos tipos de isomería: isomería geométrica e isomería posicional.

- Isomería geométrica. Los dobles enlaces entre los carbonos presentan dos posibles configuraciones: configuración *cis*, la más frecuente en la naturaleza, en la que, los dos átomos de hidrógeno están situados en el mismo plano del doble enlace y configuración *trans* en la cual, los átomos de hidrógeno están a ambos lados del plano del doble enlace.
- Isomería posicional. En función de la posición del doble enlace en la cadena hidrocarbonada. Aunque teóricamente, el doble enlace puede situarse en diferentes lugares de la cadena, existen posiciones favorecidas por la naturaleza.

Así, el doble enlace de los AGMI puede ser de geometría *cis* o *trans* y situarse en diferentes lugares de la cadena. El ácido oleico (9c 18:1), por ejemplo, tiene como isómero geométrico el ácido eláidico (9t 18:1) y por isómero posicional y geométrico el ácido vacénico (11t 18:1).

Los distintos dobles o triples dobles enlaces de los AGPI pueden ser totalmente *cis* o *trans* o bien una combinación de ambos. Así, el ácido linoleico (9c, 12c 18:2) tiene tres isómeros geométricos (9c, 12t; 9t, 12c; 9t, 12t) y un número elevado de isómeros posicionales.

Una familia de gran interés son los isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA), isómeros cuyos dobles enlaces están conjugados, separados entre sí por un único enlace sencillo, de configuración *cis/trans*, *trans/cis*, *trans/trans* y *cis/cis*. Hasta el momento se han identificado una veintena de ellos en los alimentos (AFSSA, 2005).

2. Definición de AG *trans*. Propiedades

Desde un punto de vista químico, los AG *t* son aquellos que poseen, al menos, un doble enlace de configuración geométrica *trans*. Las definiciones de AG *t* efectuadas por los diferentes organismos, presentan algunos matices. Algunos países como Estados Unidos, Canadá y Dinamarca, restringen la definición de los ácidos grasos *trans* haciendo abstracción de los isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA) de configuración *cis/trans*, *trans/cis* y *trans/trans*, cualquiera que sea la posición de los dobles enlaces. Así, la Comisión Mixta FAO/OMS del *Codex Alimentarius* los define como "ácidos grasos insaturados que contienen uno o varios dobles enlaces aislados (no conjugados) en una configuración *trans*" (OMS, 2004). Sin embargo, EFSA (*European Food Safety Authority*) los define como "todos aquellos ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados que tengan al menos un doble enlace en configuración *trans*" (EFSA, 2005).

Los isómeros geométricos *cis*, *trans* difieren en sus propiedades físico-químicas. La presencia de la configuración *trans* aumenta el punto de fusión, cambia la polaridad y modifica las propiedades espectrométricas (absorción UV, infrarroja, etc.) de los AG. Los dobles enlaces *cis* provocan la curvatura de las cadenas carbonadas mientras que los *trans* la mantienen rígida, influyendo por tanto, sobre las propiedades bioquímicas y fisiológicas de los AG. Así, la incorporación de los AGt a los fosfolípidos de las membranas celulares pueden dar lugar a una reducción significativa de la fluidez de la misma y afectar a las actividades enzimáticas asociadas a ella (Leal, 2005).

Los AGt presentan la misma cinética y utilizan las mismas vías metabólicas que los AG: betaoxidación, bioconversión y acilación. Su conversión a energía se da en la misma proporción que en los AGS.

Desde la segunda mitad del siglo XX la industria alimentaria ha incrementado la utilización de las grasas hidrogenadas. Las margarinas hechas con grasas parcialmente hidrogenadas fueron recomendadas como sustitutos saludables de las grasas animales que potencialmente incrementaban el colesterol sérico. La mayor ingesta de AGt en la población, despertó el interés de los investigadores por conocer los aspectos nutricionales y metabólicos de estas grasas y sus efectos sobre la salud.

Numerosos estudios epidemiológicos realizados desde la década de los 90 han proporcionado evidencias de una relación positiva entre ingesta de AGtHC y el incremento del riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular, mientras que los efectos de las grasas que incluyen AGt de origen natural están aún a debate con datos indicativos a favor de éstas, por diferencias en el perfil de los ácidos *trans*-monoinsaturados (Mensink et al., 2003) (Weggemans et al., 2004) (Pfeuffer y Schrezenmeir, 2006) (Mozaffarian et al., 2006) (Gebauer et al., 2007) (Chardigny et al., 2008) (Jakobsen et al., 2008) (Mozaffarian et al., 2009) (Anadón et al., 2010) (EFSA, 2010). Desde entonces, los diferentes países de la Unión Europea han financiado proyectos de investigación para conocer el contenido de AGt en los alimentos, niveles de consumo y los efectos en la población, al objeto de limitar su ingesta.

Proceso de formación de los ácidos grasos *trans*

Se han descrito tres fuentes principales de AGt en los alimentos: biohidrogenación "ruminal", hidrogenación industrial y tratamientos térmicos.

1. Biohidrogenación "ruminal"

Se produce en el rumen de las especies animales poligástricas. Es el resultado de la acción de enzimas de la flora ruminal sobre los AG de la dieta de los rumiantes que transforman los AG insaturados en AG saturados y los AGt son intermediarios en esos procesos. Parte de los ácidos grasos *trans* monoinsaturados formados en el rumen pueden posteriormente transformarse en la glándula mamaria en CLA por desaturación. Las 2 vías de transformación más estudiadas son las que parten de los ácidos linoleico y α -linolénico (Figura 1).

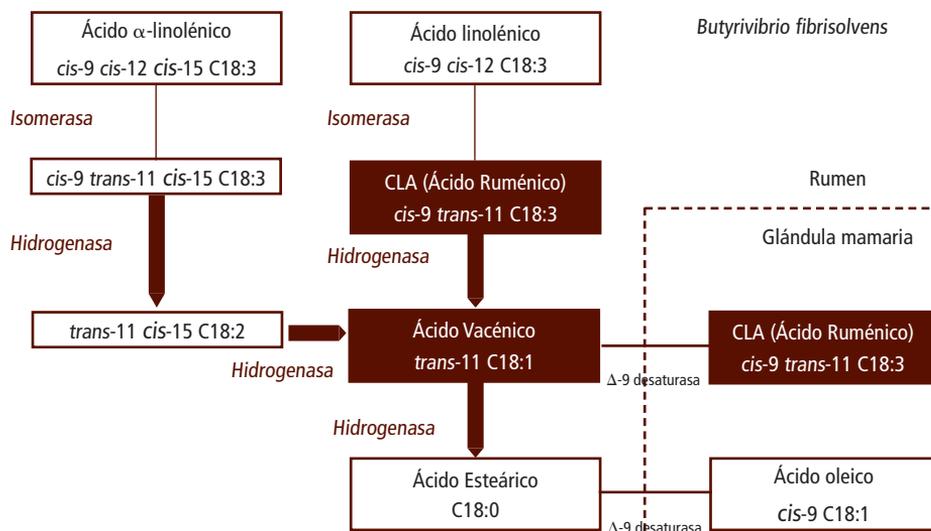


Figura 1. Vías de transformación de los AG insaturados de la dieta en los rumiantes. **Fuente:** (Bauman y Lock, 2006).

El contenido de AGt en los productos lácteos varía según el periodo estacional y la región geográfica, que incide en la alimentación del ganado. Oscila entre 2-6% del total de AG, siendo el *trans-11 C18:1* o ácido vacénico (VA) el isómero cuantitativamente más importante constituyendo del 30 al 50% de los *trans-18:1* totales. En menor proporción están los isómeros 9t a 16t 18:1 (EFSA, 2004). Por el contrario, las grasas comestibles de origen industrial obtenidas por hidrogenación pueden presentar contenidos mayores de AGt y además un perfil isomérico diferente, con contenidos similares de los isómeros t11, t10 y t9 C18:1 (Figura 2).

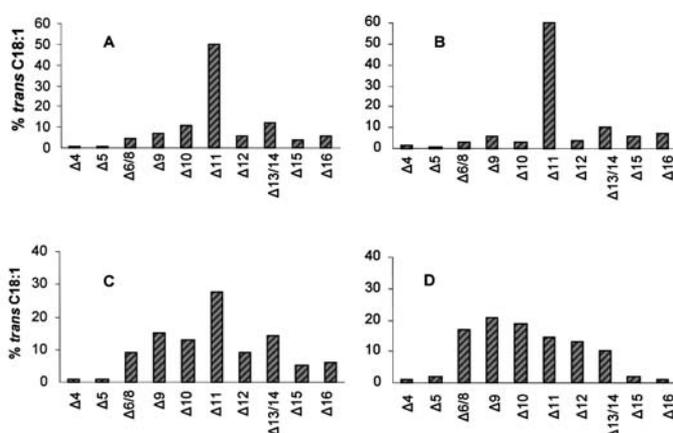


Figura 2. Distribución de los isómeros *trans* C18:1 en grasa láctea de (A) cabra, (B) vaca, (C) mujer y (D) vegetal hidrogenada. El eje de abscisas muestra la posición del doble enlace en la cadena hidrocarbonada. **Fuente:** (Shingfield et al., 2008).

La composición de los AGt C18:1 en la leche de mujer (Figura 2C) simula una mezcla de ambos perfiles, probablemente como consecuencia de la ingesta de grasas procedentes de rumiantes o de alimentos que contienen ingredientes de origen industrial.

Los AGt producidos por efecto del metabolismo ruminal se absorben en todas las etapas de las vías metabólicas, se distribuyen en el tejido mamario entre otros y se excretan finalmente a través de la leche.

Otro grupo de AG que se encuentran de forma natural en la grasa de la leche y en la carne de los rumiantes y que ha suscitado un interés creciente en las últimas décadas es el CLA. El acrónimo CLA es un término que engloba una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico con los dobles enlaces conjugados en distintas posiciones de la molécula. Numerosos estudios han demostrado la existencia de una gran variedad de moléculas de CLA en grasa láctea fruto de las distintas combinaciones de isómeros posicionales (6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15) y geométricos (*cis-trans*, *trans-cis*, *cis-cis*, *trans-trans*). La mayoría de estos isómeros se encuentran, de forma natural y en pequeñas cantidades, en la grasa de alimentos procedente de los rumiantes, fundamentalmente en los productos lácteos (Parodi, 2003) (Cruz-Hernández et al., 2006). En la leche, más del 70% del contenido en CLA se corresponde con el ácido graso *cis-9, trans-11* C18:2, ácido ruménico, al que se le atribuyen la mayoría de sus propiedades biológicas (AFSSA, 2005).

2. Hidrogenación industrial

Esta técnica se utiliza para la obtención de grasas más plásticas. Mediante este proceso los AG insaturados de los aceites vegetales se hidrogenan parcial o totalmente para producir grasas sólidas o semisólidas menos susceptibles a la oxidación.

La técnica se desarrolló en los años 30 y consiste en introducir gas hidrógeno en el aceite vegetal bajo ciertas condiciones de presión y temperatura y la presencia de un metal como catalizador. En este proceso, el doble enlace del AG puede pasar de la configuración *cis* a *trans* o cambiar de posición dentro de la cadena hidrocarbonada.

Los contenidos de AGt y de isómeros formados en las margarinas son muy variables y dependen de parámetros tales como del tipo de AG insaturados en los aceites, la naturaleza del catalizador utilizado, y de las condiciones de hidrogenación (temperatura, presión, agitación), entre otros (OMS, 1997). Los isómeros formados son, principalmente, isómeros geométricos y posicionales del ácido oleico 9c 18:1. Su perfil isomérico sigue una distribución tipo gaussiana con los contenidos más elevados para los isómeros *trans-9*, *trans-10*, *trans-11* y *trans-12* C18:1. El más abundante es el ácido eláidico 18:1 9t con un punto de fusión más elevado (43,7 °C) que el del oleico.

La formación de isómeros *trans* a partir de los AGPI, en el curso de la hidrogenación catalítica es baja, siendo los más abundantes el 9c, 12t y 9t, 12c 18:2.

Cabe destacar que como se ha indicado anteriormente los perfiles de los AGt en las grasas de las especies de animales rumiantes y en los aceites vegetales parcialmente hidrogenados guardan considerables similitudes e isómeros *trans* comunes, pero en diferentes proporciones (Tabla 1).

Tabla 1. Proporciones de isómeros *trans* 18:1 (% del total de isómeros 18:1 *trans*) en rumiantes y en grasas hidrogenadas industrialmente a partir de alimentos de consumo habitual

Isomero 18:1 <i>trans</i> n-x posición del doble enlace	Posición del doble enlace	Grasa de leche de cabra	Grasa de leche de oveja	Grasa de leche de vaca	Grasa de hidrogenadas industriales
n-2	16	10	8	6-8	1
n-3	15	6	6	4-6	2
n-4	14	9	8	8	-
n-5	13	8	7	6-7	9-12 ^a
n-6	12	9	7	6-10	8-13
n-7 (ác. vacénico)	11	37	47	30-50	10-20
n-8	10	10	9	6-13	10-20
n-9 (ác. elaidico)	9	6	5	5-10	20-30
n-10 a n-12	6-8	3	2	2-9	14-18
n-13	5	<1	<1	<1	2
n-14	4	<1	<1	<1	1

a=suma de isómeros n-4 y n-5.

Fuente: (EFSA, 2009).

3. Tratamientos térmicos

Los procesos de desodorización, tras el refinado de aceites vegetales o de pescado, o el calentamiento y fritura de los aceites a altas temperaturas, generan también AGt. Los tratamientos térmicos producen sobre todo isómeros geométricos y pocos isómeros posicionales.

La literatura científica menciona principalmente el efecto del calor sobre el ácido linoleico 9c, 12c 18:2 y el ácido (n-3) α -linolénico 9c, 12c, 15c 18:3. Las modificaciones dependen de la temperatura y del tiempo de exposición. En un estudio donde se evaluaron los efectos de la temperatura y el tiempo en la formación de isómeros *trans*, se observó, que a 150 °C se iniciaba la formación de AGt y se incrementaba significativamente a temperaturas superiores a 220 °C con el 5% y 25% de isomerización de 18:3 n-3 después de 2 y 12 horas de calentamiento, respectivamente (EFSA, 2009). Algunos países europeos han establecido que la temperatura de fritura no debe superar los 180 °C (Clayton et al., 2007).

El ácido α -linolénico es más sensible a la isomerización que el ácido linoleico y la posibilidad de formación de isómeros geométricos 18:3-*trans* es de 12 a 14 veces superior a la de 18:2-*trans*. Las tasas más elevadas se han detectado en los aceites de colza y soja (EFSA, 2005).

El calentamiento de las carnes puede también inducir la formación de AGt.

Contenido en los alimentos

El riesgo asociado al consumo de AGt depende de los alimentos que forman la dieta, de su contenido en AGt y, principalmente, de la cantidad consumida por el individuo o la población.

Hasta hace unos años, los contenidos más altos de AGt correspondían a los alimentos elaborados con grasas hidrogenadas (margarinas, *shortening* -término genérico utilizado para describir grasas y aceites

usados en la preparación de alimentos-, productos comerciales de pastelería, platos precocinados, hamburguesas, patatas fritas “de bolsa”, aperitivos o *snacks*, entre otros) y los contenidos más bajos a la carne y productos lácteos (leche, queso y yogur). EFSA (2009) señala que los AGt de origen animal de la grasa de los rumiantes se encuentran a concentraciones del 4 al 6%, mientras que los AGt producidos por medios industriales pueden presentarse en una concentración mayor. No obstante, en los últimos años, las industrias elaboradoras de grasas hidrogenadas han mejorado los procesos tecnológicos y los niveles de AGt que pueden ser bajos.

Los contenidos de AGt de los alimentos de consumo habitual son muy variables. Esta variabilidad depende, fundamentalmente, del tipo de alimento pero también, del país donde se comercializa e incluso, aunque en menor medida, pueden verse afectados por los métodos analíticos utilizados.

Respecto a la variabilidad en función del tipo de alimento los datos procedentes de una revisión realizada por Griguol et al. (2007) aportan valores de AGt en diferentes productos que llegan para algunos alimentos a cifras superiores al 20% del total de AG. No obstante, la mayor parte de las referencias de los trabajos son de la década de los 90, a partir de la cual se han producido cambios en los procesos tecnológicos de hidrogenación que han dado lugar a grasas con contenidos muy bajos de AGt (L'Abbé et al., 2009).

Con objeto de aportar datos que respondan a los contenidos actuales del consumo de AGS y AGt de la población española, el CNA realizó un estudio sobre el perfil lipídico en un total de 99 muestras distribuidas dentro de una amplia variedad de productos procesados agrupados en 12 tipos (bollería infantil, bollería industrial, cereales con chocolate, chocolates, cremas de cacao, galletas con relleno de chocolate, galletas tipo “María”, margarinas, patatas fritas, pates, aperitivos y carne y productos cárnicos) que podrían aportar a la dieta cantidades significativas de AGS y AGt. Los resultados muestran un amplio margen de variación en los niveles de grasa y en los contenidos de AGS, AGMI y AGPI, en cada grupo de productos analizados. Sin embargo, respecto al contenido de AGt el estudio concluye que su “proporción no resulta elevada”, ya que solo un 15% presentaron valores superiores a 0,5 g/100 g de grasa y un 6% valores superiores a 1 g/100 g de grasa. Un índice, a menudo utilizado para estimar el potencial grado de aterogenicidad de las muestras, que relaciona los contenidos en la suma de AGS más AGt dividido por la suma de AGMI más AGPI, se mantiene en siete de los 12 grupos analizados en valores inferiores a uno, alcanzando los niveles más altos en galletas rellenas de chocolate, bollería infantil y cereales con chocolate (Burdaspal et al., 2010).

Los contenidos de AGt en leche de vaca oscilan en general entre 1,5 y 5% del total de AG. El contenido en los distintos productos lácteos depende de la materia prima y de la cantidad de grasa en el producto, pues no se han evidenciado aumentos durante los procesos tecnológicos convencionales (Luna et al., 2004, 2005, 2007).

La carne de rumiantes presenta, en general, contenidos de AGt inferiores a los de la grasa de leche, mientras que los de preparados para cocinar, hamburguesas/carne picada, pueden depender del tipo de grasa que incluyan.

El método analítico utilizado en la determinación de AGt puede ser otra fuente de variabilidad del contenido de AGt en un alimento. La heterogeneidad de las matrices alimentarias, la naturaleza de los lípidos y la diversidad de AG, reducen las posibilidades de utilizar una única metodología analítica. Se han

propuesto varias técnicas analíticas para evaluar los AGt en matrices alimentarias. La elección de uno u otro método depende fundamentalmente de la matriz alimentaria, de la complejidad de su composición en AG y en AGt. Otro factor muy importante a tener en cuenta es la precisión y exactitud que se desee obtener. El método más utilizado para determinar el contenido total de AGt es la espectroscopía infrarroja y en segundo lugar las técnicas cromatográficas, sobre todo la cromatografía de gases. La espectroscopía infrarroja con transformada de *Fourier* parece ser la técnica más sensible para la determinación del contenido total de AGt en los alimentos. Para estimar el perfil de isómeros de AGt la cromatografía de gases es la técnica idónea, con la utilización complementaria de otra técnica de separación previa como la extracción en fase sólida o cromatografía en capa fina, ambas con impregnación de Ag⁺.

No obstante, estos métodos analíticos no permiten determinar el origen de los distintos isómeros, aunque el perfil de AGt presentes en un alimento puede ser indicativo de la presencia de grasas de origen animal o vegetales hidrogenadas.

Efectos sobre la salud. Evidencias científicas

El conocimiento del contenido de AGt en muestras de tejidos humanos y sus efectos ha dado lugar a un gran número de publicaciones. En Reino Unido, un trabajo realizado con 231 muestras de tejido adiposo humano reveló que el 5% de los AG eran *trans*. Contenidos que se atribuyeron principalmente a aceites de pescado hidrogenados que se utilizaban en altas concentraciones en la fabricación de ciertas margarinas habitualmente consumidas por esas fechas en ese país (Thomas et al., 1981).

Los AGt monoinsaturados han sido detectados en hígado, corazón, glóbulos rojos y plasma (Ohlrogge et al., 1982) y los AGt poliinsaturados (isómeros de *trans* 18:3) se han descrito en el suero humano y en la leche materna (Rocquelin et al., 1989) (Chen et al., 1995). Asimismo, se ha detectado la presencia de isómeros *trans* del ácido eicosapentaenoico en plaquetas (Chardigny et al., 1993).

Las primeras evidencias de los efectos adversos de los AGt sobre la salud se publicaron en la década de los 90 cuando estudios en humanos mostraron que su ingesta aumentaba el riesgo de padecer alteraciones cardíacas tanto o más que los AG saturados (Mensink y Katan, 1990) (Hulshof et al., 1999). Desde entonces se han llevado a cabo numerosos estudios (European Parliament, 2008), sin que hasta el momento, se haya llegado a conclusiones definitivas respecto a la concentración umbral de AGt por encima de la cual se producen efectos adversos (Zaloga et al., 2006) (Destailats et al., 2009) (EFSA, 2009). El panel de Productos Dietéticos, Nutrición y alergias de la EFSA (2010) indica que la reducción del contenido de AGt sin comprometer la adecuación a la ingesta de nutrientes esenciales tiene un límite, por lo que concluyen que la ingesta de AGt debe mantenerse lo más baja posible en el contexto de una dieta nutricionalmente adecuada.

Sin embargo, en opinión de EFSA (2010) no existe una evidencia clara de que ninguno de los isómeros CLA presentes en la dieta juegue un papel en la prevención o promoción de enfermedades relacionadas con la alimentación.

1. Efecto sobre el desarrollo fetal

Los AGt cruzan la barrera placentaria y pueden afectar al desarrollo intrauterino del feto. Algunos estudios señalan que el plasma umbilical tiene, en relación con el materno, menos 18:1 t y más 18:2 t.

Un estudio reciente muestra que los CLA atraviesan la barrera placentaria y su concentración plasmática fetal alcanzada es el doble que la concentración plasmática materna. Además los contenidos de CLA y de ácido eláidico en los triacilglicérols plasmáticos están inversamente relacionadas con la duración de la gestación, con el peso y la talla del recién nacido (Elias e Innis, 2002).

2. Efectos sobre el sistema inmune y la inflamación

Los trabajos llevados a cabo sobre el efecto de los AGt en el sistema inmune han sido poco concluyentes y se han enfocado, la mayor parte de ellos, hacia el ácido eláidico. Los resultados no han mostrado ningún tipo de efecto favorable ni adverso.

Estudios epidemiológicos han sugerido que algunos efectos adversos de los AGt procedentes de grasas hidrogenadas, estaban relacionados con algunos marcadores de inflamación (Gebauer et al., 2007).

No hay evidencias de estudios en humanos que las ingestas usuales de CLA tengan efectos beneficiosos o negativos sobre los procesos inflamatorios o sobre el sistema inmune (EFSA, 2010).

3. Efectos sobre el sistema cardiovascular

Se ha estudiado extensamente la relación entre el consumo de AGt y el riesgo cardiovascular, concluyendo, que existe una alta correlación entre ambos factores (EFSA, 2004).

Se ha sugerido que una ingesta diaria de AGt superior al 2% de la energía total ingerida incrementa significativamente la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Mozaffarian et al., 2006). El incremento del riesgo es directamente proporcional a la cantidad de AGt ingerida en un amplio inter-valor de ingesta, desde 1,3 a 16,1 g/día.

Por otra parte, se ha comprobado que los AGt monoinsaturados incrementan los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) de forma similar a la de los AG saturados (ácido palmítico, mirístico, láurico) y reducen los niveles séricos de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C). Un meta-análisis de 60 estudios (Mensink et al., 2003) señala que los AGt monoinsaturados incrementan la relación entre el contenido de colesterol total y el HDL-C y su ingesta aumenta el riesgo cardiovascular más que la de los AGS. Se desconocen los mecanismos que explicarían estos efectos y se ha sugerido la implicación de las proteínas que se unen a los esteres del colesterol y a ciertos receptores hepáticos.

Aunque hay algunos datos que indican que los AGt procedentes de los rumiantes pueden tener efectos adversos sobre las lipoproteínas y lípidos de la sangre similares a las de origen industrial, el conocimiento actual es insuficiente para establecer si ante una misma ingesta el riesgo cardiovascular es el mismo (EFSA, 2010). Existen estudios que apuntan que el consumo de cantidades moderadas de AGt procedentes de la grasa de leche podría no contribuir a aumentar los riesgos cardiovasculares (Chardigny et al., 2008). Un estudio de la Universidad de Oslo (Biong, 2008), sugería que los productos lácteos podían proteger frente al infarto de miocardio por mecanismos no relacionados con los niveles séricos de colesterol total. Sjogren et al. (2004) encontraron que la ingesta de AG como los de los productos lácteos se asoció con un perfil LDL favorable, con descenso de partículas LDL pequeñas y densas, y cuya acumulación había mostrado relación con riesgo cardiovascular (St-Pierre et al., 2005).

De hecho, dado que el ácido vacénico es precursor fisiológico del isómero mayoritario del CLA presente en la grasa de leche, 9-*cis*, 11-*trans* C18:2 (ácido ruménico) y puede transformarse no solo en la glándula mamaria sino en otros tejidos, hay estudios que concluyen que la inclusión de grasa láctea en una dieta equilibrada podría resultar más beneficiosa que perjudicial. Así, se ha asociado a leches enriquecidas en ácido vacénico y ruménico efectos potencialmente positivos para la salud (Lock et al., 2005a) (Bauman y Lock, 2006) (Shingfield et al., 2008). Por otra parte, Tyburczy et al. (2009) demostraron en modelos animales (hámsters) que la incorporación de ácido vacénico y *trans*-9 C18:1 a la dieta no influye de forma desfavorable sobre los parámetros hipercolesterolémicos. Sin embargo, trabajos recientes en modelos animales han evidenciado que grasas ricas en ácidos *trans*-10 18:1, podrían favorecer el aumento de triacilglicérols en plasma, mientras que la presencia de ácido vacénico y ruménico en grasa de leche podría incidir de forma positiva en ese parámetro (Anadón et al., 2010).

Por otra parte, se han revisado por EFSA (2004, 2010) los efectos de los AGt a partir de fuentes hidrogenadas, sobre la función hemostática y se ha concluido que los estudios realizados no proporcionan evidencias suficientes de que esos aceites hidrogenados tengan impacto sobre esa función.

En esta misma línea, un estudio realizado sobre 17 mujeres voluntarias a las que se les suministró durante 63 días una dieta enriquecida con una mezcla de 3,9 g de isómeros CLA no afectó el tiempo de coagulación *in vivo*, la agregación plaquetaria *in vitro*, el tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activado y los niveles de antitrombina III en comparación al aceite de girasol. Los isómeros más abundantes en la mezcla suministrada fueron los CLA 9c, 11t (17,5%), 8t, 10c (16,6%), 11c, 13t (23,5%) y 10t, 12c (22,6% del total) (Benito et al., 2001).

4. Efectos sobre diabetes mellitus tipo 2

En el *Nurse Health Study* se observó una relación positiva entre la ingesta de AGt y el riesgo de desarrollo de diabetes tipo 2. Dicho efecto se observó fundamentalmente en mujeres obesas, lo que podría explicarse por el hecho de presentar mayor resistencia a la insulina al inicio del estudio en comparación con las mujeres no obesas (Salmerón et al., 2001). Sin embargo en otros estudios no se mencionan estas relaciones (Meyer et al., 2001) (Van Dam et al., 2002).

5. Efectos sobre cáncer

Aunque en los países industrializados un porcentaje alto de riesgo de cáncer se ha asociado a factores dietéticos y un trabajo reciente relaciona la ingesta de AGt con riesgo de cáncer de mama (Chajes et al., 2008), se puede concluir que no hay aún evidencias científicas que permitan una relación directa entre la ingesta de AGt y el incremento del riesgo de desarrollar cáncer.

El efecto de los CLA se ha estudiado en animales, principalmente en tumores mamarios de rata, en los que se ha visto que el isómero 9c 11t C18:2 ejercería un efecto inhibitorio en la aparición y el desarrollo de estos tumores (Ip et al., 2003) (Parodi, 2006) (Lock et al., 2009). No obstante, los efectos antitumorales se han obtenido para ingestas muy altas y prolongadas y los estudios en humanos son muy limitados y no se han evidenciado efectos similares.

En la actualidad, hay coincidencia en la comunidad científica en admitir que los efectos adversos debidos a la ingesta de AGt se inician mediante cambios en el perfil de las lipoproteínas séricas aunque la respuesta inflamatoria y la función endotelial pueden verse también afectadas (SACN, 2007).

Por último cabe destacar que, hay cada vez más evidencias científicas de que la potencial incidencia en la salud de los AGt es dependiente de la composición isomérica, en particular del isómero *trans* C18:1 presente en el alimento (Lock et al., 2005b) (Malpuech-Brugère et al., 2009).

Datos de consumo

A comienzos de los 90 la ingesta de AGt en Europa se estimaba comprendida entre 2 y 17 g/día. Para conocer con precisión el contenido en AGt en los países europeos, la Comisión Europea financió el proyecto TRANSFAIR study: *Intake of fatty acids in Western Europe with emphasis on trans fatty acids* (Hulshof et al., 1999). Su objetivo fue valorar el consumo de AGt en 14 países europeos occidentales durante los años 1995 y 1996.

Los valores de la ingesta media diaria obtenida en el estudio, variaron entre los distintos países (Tabla 2). Los valores más elevados, 5,4 g/día de AGt (2,0% de la energía total ingerida) se encontraron en Islandia y los más bajos 1,5 g/día (0,5%) en Grecia e Italia. En el caso de España, la ingesta media de AGt se situaba, como se ha citado, en 2,1 g/día (0,7% del aporte total de energía) (Camacho, 2003).

El estudio concluía que, en general, el consumo de AGt en Europa occidental no era preocupante, aunque se recomendaba reducir la ingesta de ácidos grasos que afectan a la colesterolemia incluidos los AGt (Hulshof et al., 1999).

En Estados Unidos, las ingestas diarias estimadas mediante un cuestionario de frecuencias de consumo fueron de 3-4 g/día y por extrapolación de los datos de leche humana superiores a 10 g/persona (Craig-Schmidt, 2006).

País	Edades	AGt % Energía	AGt g/d
Alemania	19-64	0,8	2,2
Bélgica	18-63	1,4	4,1
Dinamarca	19-64	1,0	2,6
España	0-70	0,7	2,1
Finlandia	25-64	0,9	2,1
Francia	19-64	1,2	2,3
Grecia	23-64	0,6	1,4
Islandia	19-64	2,0	5,4
Holanda	19-64	1,6	4,3
Italia	1-80	0,5	1,6
Noruega	19-64	1,5	4,0
Portugal	38	0,6	1,6
Reino Unido	0-75	1,3	2,8
Suecia	19-64	1,1	2,6

Fuente: (Camacho, 2003) (Craig-Schmidt, 2006).

Desde la publicación de los resultados del proyecto TRANSFAIR, muchos países han realizado estudios sobre los contenidos de AGt en los alimentos de uso habitual y la industria ha comenzado a utilizar nuevas tecnologías que disminuyen su formación:

- Modificación de las condiciones del proceso de hidrogenación, presión, temperatura y naturaleza del catalizador.
- Interesterificación: proceso que implica la distribución al azar de los ácidos grasos en la molécula del glicerol en presencia de un catalizador químico, tal como metóxido de sodio o una enzima.
- Fraccionamiento: uso de fracciones de grasas de origen tropical ricas en AG saturados que permiten obtener la correspondiente de alto punto de fusión que aporta mejor estructura y plasticidad.
- Combinación de tecnologías, interesterificación, hidrogenación y fraccionamiento.

Estado actual de la legislación y otras medidas de gestión

Los diferentes organismos y agencias internacionales han emitido recomendaciones sobre la ingesta de AGt pero no existen normativas europeas al respecto.

En la Unión Europea solo están regulados en los preparados para lactantes y de continuación mediante la Directiva 141/2006/CE en la que se establece que "el contenido en AGt no será superior al 3% del contenido total en materia grasa".

La OMS (2003) recomienda que el consumo de AGt no supere el 1% del aporte energético total (2,2 g/día para una dieta de 2.000 kcal) y propone que, en su lugar, se aumenten los aportes dietéticos de AGMI y AGPI.

Los primeros en aplicar en Europa una normativa fueron las autoridades danesas que en 2003 elaboraron una regulación que entró en vigor en enero de 2004, donde se establecían límites sobre los niveles de AGt en aceites y en alimentos procesados, prohibiendo la presencia de más de un 2% del total de AGtHC. Las grasas y aceites de origen animal se excluyeron de esta legislación (Danish Veterinary and Food Administration, 2008). Suiza ha seguido la iniciativa de Dinamarca con legislación restrictiva para el uso de AGtHC (The Federal Authorities Swiss Confederation, 2008).

Desde entonces algunos países europeos han dado las siguientes recomendaciones de ingesta de AGt (EFSA, 2009).

- Países Nórdicos (Noruega, Finlandia, Suecia, Dinamarca e Islandia): un máximo del 10% de AGS y AGt del consumo energético total y recomienda dosis más bajas para las personas con hipercolesterolemia. Asimismo, señalan que para niños entre 6-11 meses la ingesta debe ser tan baja como sea posible.
- En el Reino Unido: un consumo del 10% de la ingesta energética total ó un máximo de 5 g/día de AGS y AGt.
- Francia recomienda no superar el 2% de la energía total ingerida (AFSSA, 2005).
- Alemania, Austria y Suiza: un consumo inferior al 1% del aporte energético total.

En Canadá en 2006, se ha recomendado el límite de 2% de AGt para los aceites vegetales y margarinas y un 5% para todos los otros alimentos, con excepción de los de origen animal procedentes de rumiantes (Health Canada, 2006). En Estados Unidos, la FDA recomienda mantener la ingesta de AGt tan baja como sea posible y, desde enero del 2006, estableció que se recoja en una línea separada

del etiquetado el contenido en AGt. La ciudad de Nueva York y el estado de California han sido los primeros en controlar el consumo de AGt en los alimentos, recomendando la disminución de AGt en los aceites y margarinas utilizadas para untar y freír: los productos servidos en los restaurantes desde el 2010 deben contener menos de 0,5 g de AGtHC por ración/porción y en productos de bollería se controlará a partir de 2011.

Recientemente se ha presentado una propuesta al Parlamento Europeo en la que se solicita que la Comisión limite el contenido máximo permisible de los AGt producidos industrialmente en todos los ingredientes destinados a productos alimenticios para consumo humano en la UE a un máximo del 2% del contenido total de grasas, como ya se aplica en Dinamarca.

En el futuro cabe esperar que se mantengan los contenidos bajos de AGtHC en los alimentos gracias a los cambios en el perfil de AG de las grasas disponibles comercialmente, conseguidos por la modificación de los procesos tecnológicos, y al impacto de los cambios en la legislación restrictiva para el uso de AGtHC en los alimentos.

Conclusiones del Comité Científico

Dada la potencial incidencia para la salud de AGtHC, sobre todo en relación con enfermedades cardiovasculares, se han realizado numerosos estudios para conocer sus contenidos en los distintos alimentos, así como para aportar evidencias científicas respecto a los posibles efectos adversos.

La revisión de los trabajos realizados sobre los dos aspectos de interés citados aporta datos que se resumen a continuación:

- 1) De las investigaciones realizadas se concluye que los AGt pueden incidir en riesgos cardiovasculares de forma similar o superior a los AGS. La influencia en otras enfermedades no cuenta con evidencias científicas aún contrastadas. Por el momento no se dispone de información suficiente que permita determinar si los AGt de fuentes distintas (origen animal y vegetal) difieren en sus efectos sobre el riesgo de enfermedad. Sin embargo, no se han aportado datos que permitan concluir sobre el riesgo del consumo de los AGt en alimentos de origen animal y la información también es limitada en cuanto a los efectos individuales de las distintas especies químicas de AGt.
- 2) En Europa, los contenidos de AGt en los alimentos se han reducido con respecto a los obtenidos en el informe TRANSFAIR (financiado por la UE), principalmente, gracias a la legislación establecida en distintos países en relación a los AGt, que ha conllevado cambios en los procesos tecnológicos de obtención de aceites vegetales hidrogenados.
- 3) En el informe TRANSFAIR se mencionan para España estimaciones de la ingesta de AGt de 2,1 g/día (0,7% del aporte total de energía). Datos recientes de los contenidos de AGt en distintos alimentos aportan valores muy bajos (<1% del total de AG en la mayoría de los alimentos estudiados, sin incluir los de origen animal), por lo que la ingesta de AGt se puede estimar que ha disminuido. No obstante, sería interesante concretar el valor actual de consumo de AGt en base a datos de la dieta española.

Referencias

AFSSA (2005). Agence Francaise de Securite Sanitaire des Aliments. Risques et bénéfiques, pour la santé des acides gras trans apportés par les aliments. Recommandations.

- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Martínez, M.A., Ares, I., Ramos, E., Gómez-Cortés, P., Juárez, M. y De la Fuente, M.A. (2010). Acute oral safety study of dairy fat rich in trans-10 C18:1 versus vaccenic plus conjugated linoleic acid in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48, pp: 591-598.
- Bauman, D.E. y Lock, A.L. (2006). Conjugated Linoleic Acid: biosynthesis and nutritional significance. En: *Advanced Dairy Chemistry*, 2, pp: 93-136. *Lipids*, 3ª edición, Ed. Springer, Estados Unidos.
- Benito, P., Nelson, G.J., Kelley, D.S., Bartolini, G., Schmidt, P.C. y Simon, V. (2001). The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids*, 36, pp: 229-236.
- Biong, A.S., Rebnord, H.M., Fimreite, R.L., Kerstin, U.T., Ringstad, J., Thelle, D.S. y Pedersen, J.I. (2008). Intake of dairy fat and dairy products and risk of myocardial infarction: a case-control study. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59, pp 155-165.
- Burdaspal, P.A., Ledgarda, T.M., Corrales, M.L., Delgado, P. y Marcos, V. (2010). Analisis de la composición grasa de diversos alimentos comercializados en España. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 11, pp: 69-80.
- Camacho, L. (2003). Contenido en ácidos grasos trans en alimentos, niveles de ingesta e influencia sobre la salud. *Vox Paediatrica*, 11, pp: 43-45.
- Chajes, V., Thiebaut, A.C., Rotival, M., Gauthier, E., Maillard, V., Boutron-Ruault, M.C., Joulin, V., Lenoir, G.M. y Clavel-Chapelon, F. (2008). Association between serum trans-monounsaturated unsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3NPEC Study. *American Journal of Epidemiology*, 167, pp: 1312-1320.
- Chardigny, J.M., Destailats, L., Malpuech-Brugère, C., Moulin, J., Bauman, D.E., Lock, A.L., Barbano, D.M., Mensink, R.P., Bezelgues, J.B., Chaumont, P., Combe, N., Cristiani, I., Joffre, F., German, J.B., Dionisi, F., Boirie, Y. y Sébédio, Y.L. (2008). Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results from the trans fatty acids collaboration (TRANSFACT) study. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 87, pp: 558-566.
- Chardigny, D., Sébédio, J.L., Juanéda, P., Vatelé, J.M. y Grandgirard, A. (1993). Occurrence of n-3 trans polyunsaturated fatty acids in human platelets. *Nutrition Research*, 13, pp: 1105-1111.
- Chen, Z.Y., Pelletier, G., Hollywood, R. y Ratnayake, W.M.N. (1995). Trans fatty acid isomers in canadian human milk. *Lipids*, 30, pp: 15-21.
- Clayton, A., Martin, M., Milinsk, J., Visentainer, V., Matsushita, M. y de-Souza, N. (2007). Trans fatty acid-forming processes in foods: a review. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 79, pp: 343-350.
- Craig-Schmidt, M.C. (2006). World-wide consumption of trans fatty acids. *Atherosclerosis Supplement*, 7, pp: 1-4.
- Cruz-Hernández, C., Kramer, J.K.G., Kraft, J., Santercole, V., Or-Rashid, M., Deng, Z., Dugan, M.E.R., Delmonte, P. y Yurawecz, M.P. (2006). Systematic analysis of trans and conjugated linoleic acids in the milk and meat of ruminants. *Advances in CLA Research*, 3, pp. 45-93. AOCS Press, Estados Unidos.
- Danish Veterinary and Food Administration (2008). Order on the content of trans fatty acids in oils and fats etc. Disponible en: www.uk.foedevarestyrelsen.dk/Food1Safety/Transfatty_acid/forside.htm [acceso: 25-8-2008].
- Destailats, F., Sébédio, J.L., Dioniso, F. y Chardigny, J.M. (2009). Thans fatty acids in human nutrition. *The Oil Press*. Reino Unido.
- Directiva 2006/141/CE de la Comisión de 22 de diciembre de 2006 relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE. DO L 40 de 30 de diciembre de 2006, pp: 1.
- EFSA (2004). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the presence of trans fatty acids and the effect on human health of the consumption of trans fatty acids. *The EFSA Journal*, 81, pp: 1-49.
- EFSA (2005). Opinión del Comité Científico de Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias relativa a la propuesta de la Comisión Europea sobre Alegaciones Nutricionales de ácidos grasos omega-3, grasa monoinsaturada, insaturada y poliinsaturada. *The EFSA Journal*, 253, pp: 1-29.
- EFSA (2009). Draft Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from

- the Commission related to dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, *trans* fatty acids, and cholesterol. Request N° EFSA-Q-2008-466.
- EFSA (2010). EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, *trans* fatty acids, and cholesterol. *The EFSA Journal*, 8, pp: 1461.
- Elias, S.L. e Innis, S.M. (2002). Bakery foods are the major dietary source of *trans*-fatty acids among pregnant women with diets providing 30 percent energy from fat. *Journal of the American Dietetic Association*, 102, pp: 46-51.
- European Parliament (2008). Policy Department Economic and Scientific Policy. *Trans Fatty Acids and Health: A Review of Health Hazards and Existing Legislation* IP/A/ENVI/ST/2008-19 PE 408.584.
- FDA (2006). Food and Drug Administration. Food labeling: *trans* fatty acids in nutrition labelling, nutrient content claims and health claims. Disponible en: www.cfsan.fda.gov/~acrobat/fr03711a.pdf [acceso: 25-8-2008].
- Gebauer, S.K., Psota, T.L. y Kris Etherton, P.M. (2007). The diversity of health effects of individual *trans* fatty acid isomers. *Lipids*, 42, pp: 787-799.
- Griguol, V., León-Camacho, M. y Vicario, I.M. (2007). Revisión de los niveles de ácidos grasos *trans* encontrados en distintos tipos de alimentos. *Grasas y aceites*, 58, pp: 87-98.
- Health Canada, (2006). "TRANSforming the food supply: Report of the Trans Fat Task Force Submitted to the Minister of Health," June 2006, Health Canada.
- Hulshof, K.F., van Erp-Baart, M.A., Anttolainen, M., Becker, W., Church, S.M., Couet, C., Hermann-Kunz, E., Kesteloot, H., Leth, T., Martins, I., Moreiras, O., Moschandreas, J., Pizzoferrato, L., Rimestad, A.H., Thorgeirsdottir, H., van Amelsvoort, J.M., Aro, A., Kafatos, A.G., Lanzmann-Petithory, D. y van Poppel, G. (1999). Intake of fatty acids in Western Europe with emphasis on *trans* fatty acids: the TRANSFAIR study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53, pp: 143-157.
- Ip, M.M., Masso-Welch, P.A. e Ip, C. (2003). Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: role of stroma and the epithelium. *Journal Mammary Gland Neoplasia*, 8, pp: 103-118.
- Jakobsen, M.U., Overvad, K., Dyerberg, J. y Heitmann, B.L. (2008). Intake of ruminant *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease. *International Journal of Epidemiology*, 37, pp: 173-182.
- L'Abbe, M.R., Stender, S., Skeaff, M., Ghafoorunissa y Tavella, M. (2009). Approaches to removing *trans* fats from the food supply in industrialized and developing countries. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, pp: S50-S67.
- Leal, A.O. (2005). Ácidos grasos *trans*, *cis* y *lipo*: evidencia actual de su influencia sobre la salud infantil. *Acta Pediátrica Española*, 63, pp: 22-26.
- Legrand, P. (2008). Intérêt nutritionnel des principaux acides gras des lipides laitiers. *Sciences des Aliments*. 28, pp: 34-43.
- Lock, A.L., Horne, C.A.M., Bauman D.E. y Salter, A.M. (2005a). Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile in cholesterol-fed hamsters. *Journal of Nutrition*, 135, pp: 1934-1939.
- Lock, A.L., Parodi, P.W. y Bauman, D.E. (2005b). The biology of *trans* fatty acids: Implications for human health and the dairy industry. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60, pp: 134-142.
- Lock, A.L., Kraft, L., Rice, B.H., Dale, E. y Bauman, D.E. (2009). Biosynthesis and biological activity of ruminic acid: a natural CLA isomer. En: *Trans Fatty A in Human Nutrition*, pp: 195-230, 2ª Edición. The Oil Press, Reino Unido.
- Luna, P., Martín-Diana, A.B., Alonso, L., Fontecha, J., De La Fuente, M.A., Requena, T. y Juárez, M. (2004). Effects of milk fat replacement by PUFA enriched fats on n-3 fatty acids, conjugated dienes and volatile compounds of fermented milks. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, pp: 417-423.
- Luna, P., Fontecha, J., Juárez, M. y De la Fuente, M.A. (2005). Conjugated linoleic acid in ewe milk fat. *Journal of Dairy Research*, 72, pp: 415-424.
- Luna, P., Juárez, M. y De la Fuente, M.A. (2007). Conjugated linoleic acid content and isomer distribution during ripening in three varieties of cheeses protected with designation of origin. *Food and Chemical*, 103, pp: 1465-1472.

- Malpuech-Brugère, C., Morio, B. y Mensink, R.P. (2009). Dietary *trans* fatty acids and cardiovascular disease risk. *Trans Fatty Acids in Human Nutrition*, pp: 307-318. The Oily Press, Reino Unido.
- Mensink, R.P. y Katan, M.B. (1990). Effect of dietary *trans* fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *The New England Journal of Medicine*, 323, pp: 439-445.
- Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A.D. y Katan, M.B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal Clinical Nutrition*, 77, pp: 1146-1155.
- Meyer, K.A., Kushi, L.H., Jacobs, D.R. y Folsom, A.R. (2001). Dietary fat and incidence of type 2 diabetes in older Iowa women. *Diabetes Care*, 24, pp: 1528-1535.
- Mozaffarian, D., Aro, A. y Willett, W.C. (2009). Health effects of *trans*-fatty acids: experimental and observational evidence. *European Journal Clinical Nutrition*, 63, pp: 55-521.
- Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J. y Willett, W.C. (2006). *Trans* fatty acids and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 354, pp: 1601-1613.
- Ohlogge, J.B., Gulley, R.M. y Emken, E.A. (1982). Occurrence of octadecenoic fatty acid isomers from hydrogenated fats in human tissue lipid classes. *Lipids*, 17, pp: 551-557.
- OMS (1990). Organización Mundial de la Salud. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report Series 797. Ginebra, 1990.
- OMS (1997). Grasas y aceites en la alimentación humana. Consulta FAO/OMS de expertos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición, 56.
- OMS (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO Serie de Informes Técnicos 916. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/AC911E/AC911E00.HTM> [acceso: 23-10-09].
- OMS (2004). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del codex sobre nutrición y alimentos para regímenes especiales. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/codex/ccnfsdu26/nf26_11s.pdf [acceso: 24-10-09].
- Orden Ejecutiva N° 160 de 11 marzo 2003. Contenido en ácidos grasos *trans* en aceites y grasas. Dinamarca.
- Parodi, P.W. (2006). Nutrition Significance of milk lipids. *En: Advances Dairy Chemistry, 2, Lipids*, pp: 601-63. Ed. Springer, Estados Unidos.
- Parodi, P.W. (2003). Conjugated linoleic acid in food. *Advances in CLA Research*, 2, pp: 101-122. AOCS Press, Estados Unidos.
- Pfeuffer, M. y Schrezenmeir, J. (2006). Impact of *trans* fatty acids of ruminant origin compared with those from partially hydrogenated vegetable oils on CHD risk. *International Dairy Journal*, 16, pp: 1383-1388.
- Rocquelin, G., Guenot, L., Astorg, P.O. y David, M. (1989). Phospholipid content and fatty acid composition of human heart. *Lipids*, 24, pp: 775-780.
- SACN (2007). Scientific Advisory Committee on Nutrition. Update on trans fatty acids. Position statement by the Scientific Advisory Committee on Nutrition Disponible en: http://www.sacn.gov.uk/pdfs/sacn_trans_fatty_acids_report.pdf [acceso: 1-05-2010].
- Salmerón, J., Hu, F., Manson, J., Stampfer, M., Graham, A., Colditz, H., Rimm, E. y Willett, W. (2001). Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, pp: 1019-1026.
- Shingfield, K.J., Chilliard, Y., Toivonen, V., Kairenius, P. y Givens, D.I. (2008). *Trans* fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606, pp: 3-65.
- Sjogren, P., Rosell, M., Skoglund-Andersson, C., Zdravkovic, S., Vessby, B., De, F.U., Hamsten, A., Hellenius, M.L. y Fisher, R.M. (2004). Milk-derived fatty acids are associated with a more favourable LDL particle size distribution in healthy men. *Journal of Nutrition*, 134, pp: 1729-1735.
- St-Pierre, A.C., Cantin, B., Dagenais, G.R., Mauriege, P., Bernard, P.M., Despres, J.P. y Lamarche, B. (2005). Low density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13-year follow-up data from the Quebec Cardiovascular Study. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 25, pp: 553-559.

- The Federal Authorities Swiss Confederation (2008). Verordnung des EDI über Speiseöl, Speisefett und daraus hergestellte Erzeugnisse. 817.022.105. Disponible en: <http://www.admin.ch/ch/d/sr/8/817.022.105.de.pdf> [acceso: 25-8-2008].
- Thomas, L.H., Jones, P.R., Winter, J.A. y Smith, H. (1981). Hydrogenated oils and fats: the presence of chemically-modified fatty acids in human adipose tissue. *American Journal Clinical Nutrition*, 34, pp: 877-886.
- Tyburczy, C., Major, C., Lock, A.L., Destailats, F., Lawrence, P., Brenna, J.T., Salter, A.M. y Bauman, D.E. (2009). Individual *trans* octadecenoic acids and partially hydrogenated vegetable oil differentially affect hepatic lipid and lipoprotein metabolism in golden syrian hamsters. *Journal of Nutrition*, 139, pp: 257-263.
- Uauy, R., Aro, A., Clarke, R., Ghafoorunissa, R., L'Abbe, M., Mozaffarian, D., Skeaff, M., Stender, S. y Tavella, M. (2009). WHO Scientific Update on *trans* fatty acids: summary and conclusions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, pp: S68-S75.
- Van Dam, R.M., Willett, W.C., Rimm, E.B., Stampfer, M.J. y Hu, F.B. (2002). Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care*, 25, pp: 417-424.
- Weggemans, R.M., Rudrum, M. y Trautwein, E.A. (2004). Intake of ruminant versus industrial *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease-what is the evidence? *European Journal Lipid SciencesTechnology*, 106, pp: 390-397.
- Zaloga, G.P., Harvey, K.A., Stillwell, W. y Siddiqui, R. (2006). *Trans* fatty acids and coronary heart disease. *Nutrition in Clinical Practice*, 21, pp: 505-512.

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre las directrices generales respecto a las condiciones que deben cumplir los materiales poliméricos de envasado de alimentos para ser sometidos a radiaciones ionizantes

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferri, M^a Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-006

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 19 de mayo de 2010

Grupo de Trabajo

Perfecto Paseiro Losada (Coordinador)
Arturo Anadón Navarro
Juan Francisco Cacho Palomar

115

revista del comité científico nº 12

Resumen

La irradiación de alimentos está autorizada en numerosos países aunque con diferentes restricciones en cuanto al tipo de alimento, dosis absorbida, etc. La Unión Europea (UE) autoriza únicamente la irradiación de hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales a una dosis máxima de irradiación de 10 kGy. Algunos Estados miembros autorizan en sus respectivas legislaciones nacionales la irradiación de otros tipos de alimentos e ingredientes alimentarios.

La mayoría de los productos alimenticios se irradian ya envasados. La irradiación de envases plásticos origina radicales libres e iones que afectan tanto al polímero como a los compuestos de bajo peso molecular presentes en el material. La magnitud de las alteraciones que se producen, tanto químicas como físicas, dependen de la naturaleza del material, dosis de radiación absorbida, atmósfera circundante, tasa de dosis, temperatura, tiempo después de la irradiación y contacto con simulantes de alimentos.

Los compuestos químicos que se forman como consecuencia del proceso de irradiación se denominan productos de radiólisis (RPs), los cuales pueden migrar desde el envase al alimento y afectar su seguridad y características organolépticas.

En Estados Unidos están autorizados un limitado número de materiales de contacto alimentario, que deben cumplir determinadas especificaciones recogidas en su marco legal. En la UE no se han desarrollado todavía medidas específicas sobre las condiciones que deben cumplir estos materiales.

En espera de la elaboración de una reglamentación específica, es recomendación de este Comité que los materiales que vayan a ser irradiados deben haber sido sometidos a pruebas experimentales exhaustivas, que demuestren que tras el proceso de irradiación y con posterioridad al mismo no se han formado productos que puedan migrar a los alimentos y representar un peligro para la salud humana.

Palabras clave

Envases, alimentos, irradiación, productos de radiólisis, migración.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on general guidelines regarding conditions that must be met by polymeric packaging materials subjected to ionisation irradiation.

Abstract

Food irradiation is authorized in many countries but with different restrictions on the type of food, absorbed dose, etc. The European Union (EU) only authorizes the irradiation of dried aromatic herbs, spices and vegetable seasonings to a maximum overall average absorbed radiation dose of 10 kGy. Some Member States authorize in their respective national legislations the irradiation of other types of foods or food ingredients.

Most foodstuffs are irradiated after being packaged. The irradiation of plastic packaging gives rise to free radicals and ions, which affect the polymer as well as the low molecular weight compounds present in the material. The magnitude of the changes that happen, both chemical and physical, depends on the nature of the material, radiation absorbed dose, the surrounding atmosphere, dose rate, temperature, time after irradiation and contact with food simulants.

Chemical compounds formed as a result of the irradiation process are called radiolysis products (PRs), which can migrate from the packaging to the food and affect its safety and organoleptic characteristics.

In USA, a limited number of food contact materials are authorized, which must meet certain specifications in its legal framework. In the EU, specific measures regarding the conditions to be met by these materials are not developed yet.

Pending the development of a specific regulation, this Committee recommends that materials intended to be irradiated should have been subjected to extensive experimental evidence, showing that after the irradiation process no products were formed that may migrate to food and pose a hazard to human health.

Key words

Packaging, foods, irradiation, radiolysis products, migration.

Introducción

Este Comité ha sido demandado por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) para establecer, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, directrices generales respecto a las condiciones que deben cumplir los materiales de envasado de alimentos para ser sometidos a radiaciones ionizantes, evaluando los efectos de la radiación sobre dichos materiales, así como la seguridad de los mismos.

La irradiación de alimentos es el tratamiento mediante radiaciones ionizantes (rayos *gamma*, rayos X o electrones acelerados) de los productos alimenticios, con la finalidad de combatir agentes patógenos, reducir la carga microbiana e infestación por insectos, inhibir la germinación de vegetales y prolongar la duración de los productos perecederos (*Codex Alimentarius*, 2003a).

Este proceso implica la exposición del alimento, envasado o no, a cantidades controladas de radiaciones ionizantes durante un lapso de tiempo para conseguir los objetivos deseados. El *Joint Expert Committee on Food Irradiation* (JECFI) formado por la *Food and Agricultural Organization* (FAO), *World Health Organization* (WHO) y la *International Atomic Energy Agency* (IAEA) evaluó los datos disponibles desde 1964 a 1980 y concluyó que la irradiación de cualquier producto alimenticio hasta una dosis media total de 10 kGy no representa un peligro toxicológico, ni introduce problemas microbiológicos o nutricionales especiales en los alimentos (JECFI/IAEA, 1999).

En 1997 se constituyó el *Joint FAO/IAEA/WHO Study Group* para evaluar la salubridad de los alimentos irradiados con dosis superiores a 10kGy, concluyendo que el consumo de alimentos irradiados a la dosis adecuada para conseguir el efecto tecnológico deseado es seguro e idóneo nutricionalmente. Señalando que no hay bases científicas para limitar la dosis absorbida por los alimentos, tratados en conformidad con las buenas prácticas de fabricación, a un nivel máximo de 10 kGy (Joint FAO/IAEA/WHO Study Group, 1999).

Tomando como base los estudios anteriormente citados, la Comisión del *Codex Alimentarius* elaboró la Norma General del *Codex* para Alimentos Irradiados (*Codex Alimentarius*, 2003b), la cual establece, entre otros puntos, las fuentes de radiación autorizadas (rayos gama procedentes de los radionucleidos ^{60}Co o ^{137}Cs , rayos X generados por máquinas que funcionen con una energía igual o inferior a 5 MeV y electrones generados por máquinas que funcionen con una energía igual o inferior a 10 MeV), y la dosis máxima total absorbida por un alimento que no deberá exceder de 10 kGy, excepto cuando ello sea necesario para lograr una finalidad tecnológica legítima.

Tanto el Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Tratamiento de los Alimentos por Irradiación (*Codex Alimentarius*, 2003a) como la Norma general han sido recomendadas a todos los gobiernos miembros del *Codex* para su aceptación desde 1984, con la finalidad de armonizar los Reglamentos técnicos y normas y no crear obstáculos innecesarios al comercio internacional, ya sea en el marco del acuerdo sobre medidas sanitarias y fitosanitarias como del acuerdo sobre barreras técnicas al comercio (ICGFI, 1998).

En Europa, el *Scientific Committee on Food* (SCF) en los informes de 1986 (SCF, 1989), 1992 (SCF, 1994) y 1998 (SCF, 1998), y tras analizar los datos disponibles llega a similares conclusiones que el JECFI, considerando aceptable la irradiación de los alimentos evaluados, clasificados y listados a las dosis de radiación indicadas, siempre inferiores a 10 kGy. En su informe del año 2003 (SCF, 2003), el SCF consideró que con la nueva información disponibles no podía aceptar la sugerencia propuesta en

el informe del *Joint FAO/IAEA/WHO Study Group* de extender de manera general la seguridad de los alimentos irradiados a cualquier alimento y a cualquier dosis.

En España, el Comité Científico de la AESAN emitió una opinión (AESAN, 2004) sobre la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos donde, entre otras conclusiones, se recoge que "desde el punto de vista toxicológico, los alimentos irradiados con dosis de hasta un máximo de 10 kGy no conducen a efectos adversos para la salud humana".

La Norma del *Codex* influyó en las decisiones que numerosos países adoptaron respecto a la irradiación de alimentos. En la actualidad más de 55 países (Argentina, Australia, India, Nueva Zelanda, Estados Unidos, etc.) tienen autorizada la irradiación de alimentos, aunque con diferentes restricciones en cuanto a la dosis absorbida por el alimento, tipo de alimento, etc. Una base de datos actualizada puede ser consultada en la IAEA (IAEA, 2009).

En la Unión Europea, la irradiación está actualmente regulada mediante las Directivas 1992/2/CE y 1993/3/CE, autorizándose únicamente, a nivel comunitario, la irradiación de hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales a una dosis máxima de irradiación de 10 kGy y en instalaciones previamente aprobadas. Algunos Estados miembros (Bélgica, Francia, Holanda, Italia, Polonia y Reino Unido) autorizan en sus respectivas legislaciones nacionales la irradiación de otros tipos de alimentos e ingredientes alimentarios (patatas, arroz, frutas, pollo, clara de huevo, gambas, etc.) así como la dosis de radiación máxima (Comunicación 2006/C112/05), aunque de nuevo, en ningún caso se autoriza una dosis máxima total de irradiación superior a 10 kGy.

Dado que la mayoría de los productos alimenticios se irradian ya envasados, con la finalidad de prevenir la recontaminación y mantener la calidad del alimento, es importante desde el punto de vista de la seguridad alimentaria considerar la influencia de la irradiación sobre los materiales del envase. Cuando el envase es apropiado, la irradiación no debe comprometer las propiedades funcionales del envase ni facilitar la migración de componentes indeseables desde el material al alimento (*Joint FAO/IAEA/WHO Study Group*, 1999) (IAEA, 1998).

Tanto la Norma General del *Codex* como las regulaciones Europeas reconocen en sus textos que la irradiación también se realiza en alimentos previamente envasados:

- La Recomendación del *Codex* (CAC/RCP 19-1979, Rev. 1-2003) en el apartado 3.2 Manipulación, almacenamiento y transporte indica que si se trata de productos envasados debe mantenerse la integridad del envase, y en el apartado 4. Envasado "envasarse en materiales que constituyan una barrera eficaz contra la recontaminación y reinfestación".
- La Norma General del *Codex* (CODEX STAN 106-1983, Rev. 1-2003) indica que "Los alimentos que vayan a irradiarse y los materiales para su envasado deberán ser de calidad adecuada, poseer condiciones higiénicas aceptables, ser apropiados para este procedimiento y manipularse, antes y después de la irradiación, conforme a prácticas adecuadas de fabricación, habida cuenta de los requisitos tecnológicos particulares del procedimiento"
- La Directiva 1992/2/CE en su Artículo 7, apartado f) indica que las instalaciones de irradiación deben llevar un Registro del material de envasado utilizado durante la irradiación y en su artículo 10 que "El material que se utilice para envasar los productos alimenticios que vayan a ser irradiados deberá ser apropiado para dicho fin".

A pesar de este reconocimiento explícito que los materiales de envasado son también irradiados, de momento ni el Codex ni la UE han desarrollado medidas específicas sobre las condiciones que deben cumplir los materiales irradiados destinados a entrar en contacto con alimentos. Siendo únicamente de aplicación en la UE el Reglamento (CE) N° 1935/2004 en cuanto a los requisitos generales indicados en su artículo 3. Por tanto, las especificaciones que deben cumplir los envases que van a ser utilizados para la irradiación de alimentos están sujetos a las respectivas regulaciones nacionales.

Ya que los materiales poliméricos constituyen el núcleo más importante y problemático para el envasado de los alimentos, este informe se centrará básicamente en el problema que plantean estos materiales.

1. Materiales plásticos

Los plásticos están básicamente constituidos por polímeros de elevado peso molecular (desde miles a millones de Daltons) o en el caso de polímeros altamente entrecruzados de peso molecular esencialmente infinito a los que se añaden otras sustancias destinadas a modificar las características y/o conseguir determinados efectos técnicos, aditivos, cargas inorgánicas, colorantes.

El material polimérico es sintetizado desde sustancias de más bajo peso molecular, en algunos casos sustancias discretas, bien definidas como monómeros u otros bloques de construcción y en otros casos sustancias de composición variable o desconocida o complejos productos de reacción tales como oligómeros, prepolímeros o polímeros comercialmente conocidos como resinas (por ejemplo: epoxy resinas, resinas poliisocianato, resinas acrílicas, resinas de polioles, etc.). Como consecuencia del proceso de síntesis o formación del polímero estas sustancias pueden permanecer sin reaccionar en su interior, como impurezas del mismo.

Los materiales poliméricos de elevado peso molecular son prácticamente insolubles en los alimentos, inertes, fisiológicamente inactivos y no migran a los alimentos, pero aunque lo hicieran no serían absorbidos en el tracto intestinal, pues es asumido y generalmente reconocido que las especies químicas con peso molecular superior a 1.000 Daltons no son biodisponibles por vía oral. El material polimérico en sí no constituye un motivo de preocupación desde un punto de vista toxicológico.

Las sustancias de bajo peso molecular, inferior a 1.000 Daltons, que se encuentran en el material plástico, tales como residuos de las reacciones de polimerización, aditivos, productos de descomposición o productos intermedios de reacción que se han originado durante el proceso de síntesis o la manufactura del material plástico, pueden migrar, son solubles en los medios acuosos y/o oleosos de los alimentos o en el medio etanólico en el caso de bebidas alcohólicas, algunas todavía muy reactivas y todas ellas fisiológicamente activas. Estas sustancias de bajo peso molecular constituyen un motivo de preocupación cuya potencial toxicidad debe ser valorada y su migración restringida para garantizar la seguridad del alimento.

Efectos de la irradiación sobre los materiales de envasado

La interacción de la radiación con los materiales del envase origina principalmente radicales libres e iones que afectan tanto al polímero como a los compuestos de bajo peso molecular ya presentes en el material plástico.

El polímero puede sufrir dos posibles reacciones: las que incrementan su grado de entrecruzamiento y tienden a incrementar su peso molecular, lo cual reduciría la migración, y las que rompen las cadenas poliméricas originando productos de degradación o sustancias de peso molecular más bajo, ambas reacciones pueden competir en un mismo polímero y originar, además de los cambios químicos, cambios físicos y estructurales que afecten a la integridad del envase (por ejemplo: propiedades barrera, propiedades mecánicas, sellabilidad, color, etc.) (Welle et al., 2002) (Morehouse, 2002) (Morehouse et al, 2004) (Haji-Saeid et al., 2007) (Komolprasert et al., 2008).

Los aditivos, monómeros residuales y otros compuestos de bajo peso molecular también pueden sufrir reacciones químicas que alteren su naturaleza y den lugar a la formación de nuevos compuestos.

Los compuestos de degradación que se forman en el material plástico como consecuencia del proceso de irradiación se denominan productos de radiólisis (RPs), los cuales pueden migrar al alimento y afectar su seguridad y características organolépticas.

La magnitud de estas alteraciones, bien documentada y recopilada, depende de la naturaleza del material y de seis parámetros relevantes (Paquette, 2004):

- 1) La dosis absorbida. Inicialmente conduce a un incremento en el grado de entrecruzamiento, especialmente en ausencia de oxígeno; superado un punto óptimo la ruptura de cadenas es el proceso dominante y los RPs se incrementan linealmente con la dosis absorbida.
- 2) La atmósfera circundante. En presencia de oxígeno, la ruptura de cadenas conduce a productos de degradación oxidados, compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles tales como aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos. En vacío o atmósfera inerte predomina la reacción de entrecruzamiento.
- 3) La tasa de dosis. Para iguales valores de dosis absorbida, la tasa de dosis de los rayos *gamma* producen mayor cantidad de RPs que la tasa de dosis de Rayos X o haces de electrones.
- 4) La temperatura. Cuando la temperatura se eleva por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero la concentración de RPs se incrementa de manera significativa.
- 5) El tiempo después de la irradiación. Con posterioridad a la irradiación del polímero la concentración de RPs se incrementa, lo que apunta a que los radicales hidroxilo atrapados en la matriz polimérica continúan reaccionando hasta su agotamiento.
- 6) El contacto con simulantes de alimentos. En general, el contacto con el simulante produce una mayor cantidad de RPs.

1. Efectos sobre las propiedades físico-mecánicas

La irradiación afecta a la fuerza del sellado e integridad del envase de bolsas multicapa irradiadas a dosis > 44 kGy; la γ -irradiación > 30 kGy decolora materiales mono y multicapa semirígidos de HDPE, PS, PP, PET, PVC/HDPE HDPE/PA, por el contrario dosis de 5-10 kGy no producen cambios significativos en las propiedades mecánicas y permeación de films multicapas de PP, EVOH, LDPE, LLDPE, PA y un ionómero (Goulas et al., 2003).

Films de PET/PET/LDPE son más resistentes a la radiación que BOPP/PP y sus propiedades barrera mejoran ligeramente hasta 15 kGy, en cambio la permeabilidad al oxígeno de este último se incrementa hasta un 25% (Mizani et al., 2009).

Las propiedades mecánicas de multicapas flexibles de PET/LDPE/EVOH/LDPE se deterioraron más

por irradiación con haces de electrones (hasta 120 kGy) que los basados en PET/PP, si bien en estos últimos se reducen considerablemente las propiedades sellantes (Oliveira et al., 2009).

La *gamma* irradiación de *films* de PAN desde 20 a 100 kGy muestra cambios en el color, incremento de la microdureza y deterioro de las propiedades mecánica, térmicas y estructurales (Pawde y Deshmukh, 2008).

2. Cambios químicos. Formación de productos de radiólisis (RPs)

Numerosos estudios demuestran que la irradiación de materiales plásticos conduce a la formación de RPs, volátiles y no volátiles, que pueden migrar a los alimentos y afectar a las características organolépticas (sabor y olor) y seguridad de los alimentos irradiados (Riganakos et al., 1999) (Demertzis et al., 1999) (Sadler et al., 2001) (Stoffers et al., 2004) (Chytiri et al., 2005) (Park et al., 2006) (Felix, 2008).

La irradiación de diferentes tipos de PE y PP conteniendo antioxidantes da lugar a la formación de productos de radiólisis como 2,4-diterbutil-fenol (2,4-DTBP), 1,3-diterbutil benzeno (1,3-DTBB) y tolueno desde Irgafox 168 e Irganox 1076, incrementándose su concentración al aumentar la dosis absorbida (Jeon et al., 2007).

La irradiación con dosis desde 5 a 60 kGy de *films* multicapa, basados en PA 6 y LDPE conteniendo diferentes aditivos, en contacto con el simulante isooctano mostro la formación y migración de numerosos compuestos (24 hidrocarburos saturados, 2 alquenos, 3 cetonas y 1 aldehído); encontrándose en mayor proporción 3,3-dimetilbutanamida y 2,2,4-trimetil-3-pentanona a 10 kGy, 2,2,3,3,6,8,8-heptametilnonano a 30 y 60 kGy y 2,6-dimetilhexano, 3,6-dimetilundecano y 2,2,4,4-tetrametiloctano. El rango de concentraciones abarca desde 12,3 a 64,9 mg/l⁻¹ (Chytiri et al., 2008).

Los niveles de caprolactama en *films* de PA 6 aumentan, en general, al incrementar la irradiación desde 3 a 12 kGy (Araújo et al., 2008).

Autorización de los materiales de envasado: situación en otros países

En la década de los sesenta y a comienzo de los setenta, en Estados Unidos se investigó sobre los efectos de la irradiación en un reducido grupo de materiales de interés para la *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) para definir que materiales serian utilizados en el programa espacial. Como consecuencia de estos estudios, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó un limitado número de materiales (CDC, 2005).

En la actualidad los materiales de envase utilizados en la irradiación de alimentos deben cumplir con alguna de las siguientes especificaciones:

- Los requerimientos establecidos en el 21 CFR 179.45 *Packaging materials for use during the irradiation of prepackaged foods*, donde se recoge una lista de materiales aprobados para usar en la irradiación de alimentos así como la dosis máxima a la que pueden ser sometidos: celofán recubierto de nitrocelulosa, papel cristal (*Glassine*), cartón recubierto de cera, *film* de poliolefina, papel Kraft, *film* de polietilentereftalato (PET), *film* de poliestireno, *Rubber hydrochloride film*, *film* de copolímero cloruro de vinilo-cloruro de vinilideno, nylon 11 (poliamida-11), copolímero acetato de vinilo-etileno, papel vegetal, *film* de polietileno (polímero básico), *film* de polietilentereftalato (PET), nylon 6 (poliamida-6) y *film* de copolímero cloruro de vinilo-acetato de vinilo (FDA, 2009a).

- Estar listada como *Effective Food Contact Substance (FCS) Notifications* bajo la "section 409(h)(2)(C) of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (21 U.S.C. 348 (h)(2)(C))". Una *Food Contact Notification (FCN)* es únicamente efectiva para el fabricante o proveedor identificado en la notificación. En la actualidad no hay ningún material de envase incluido en esta lista.
- Estar listada como exención al Umbral de Regulación, bajo 21 CFR 170.39 *Threshold of regulation for substances used in food-contact article*. Actualmente, la lista incluye materiales específicos de compañías industriales, tales como bandejas de poliestireno recubiertas, *films* multicapa con base de resinas de polibutileno y ionómero, *films* de poliamida 6/66 y 6/12 para el cierre de bandejas de poliestireno. Únicamente se pueden utilizar en contacto con carne picada durante la irradiación en atmósferas de nitrógeno o al vacío y a dosis que no excedan 3,0 kGy (FDA, 2009b).

En Canadá, los materiales que van a ser sometidos conjuntamente con el alimento a tratamiento con radiaciones ionizantes deben ser evaluados previamente a su uso. Si el material no está listado para este uso específico en el *Reference Listing of Accepted Construction Materials, Packaging Materials and Non-Food Chemicals*, publicado por la *Canadian Food Inspection Agency*, el procesador debe asesorarse sobre la idoneidad de dicho material en la *Health Products and Food Branch, Health Canada* (Health Canada, 2002).

En Francia, las empresas que fabrican o importan materiales u objetos destinados a ser tratados con radiaciones ionizantes a dosis superiores a 10 kGy deben solicitar una autorización y son evaluados por la *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)*, que desarrolló unas líneas guía para la elaboración de la documentación que debe presentar el peticionario (AFSSA, 2006).

Los que van a ser irradiados a dosis iguales o inferiores a 10 kGy son objeto de declaración, pero no necesitan autorización previa. Sin embargo, AFSSA considera que es esencial asegurarse que la irradiación a dosis iguales o inferiores a 10 kGy no implique cambios que afecten a la seguridad y calidad de los alimentos y recomienda que estos materiales sean también evaluados previamente a su puesta en el mercado (AFSSA, 2007).

Criterios para la elección de envases sometidos a radiaciones ionizantes

La irradiación puede producir cambios físicos y estructurales que influyen en las propiedades barrera, permeabilidad a gases, propiedades mecánicas, sellabilidad, color, etc., y cambios químicos conducentes a la formación de nuevas sustancias o al incremento de las ya existentes.

Estos cambios pueden afectar tanto a la conservación del producto alimenticio envasado como a la seguridad del mismo desde el punto de vista de la formación y migración de sustancias químicas al alimento.

Es importante regular y, en su ausencia, establecer directrices generales respecto a las condiciones que deben cumplir los materiales de envasado de alimentos para ser sometidos a radiaciones ionizantes.

En tanto en cuanto no se elabore una reglamentación específica, los materiales que vayan a ser irradiados deben someterse a pruebas experimentales que demuestren que tras el proceso de irradiación no solo cumplen con las reglamentaciones europeas o nacionales que son de aplicación (por ejemplo: la de materiales plásticos), sino también que durante dicho proceso y con posterioridad a la irradiación no se han formado productos de radiólisis que puedan migrar a los alimentos y representar un peligro para la salud humana.

Dichas pruebas deben corresponder a las más estrictas condiciones previsibles durante el proceso de irradiación: dosis absorbida, tasa de dosis, temperatura, composición de la atmósfera de envasado, tiempo después de la irradiación, etc.

El estudio analítico de los posibles RPs formados debe ser exhaustivo, utilizando todas las técnicas analíticas necesarias para la identificación y cuantificación de los mismos, tanto en el material como en los alimentos o simulantes de alimentos utilizados en las pruebas. La presencia de sustancias no incluidas en listas autorizadas debe ir acompañada de información sobre sus propiedades físico-químicas, microbiológicas y toxicológicas.

Con la finalidad de facilitar la elaboración, por los sectores afectados, de la documentación necesaria para llevar a cabo la evaluación de la seguridad de los materiales en contacto con alimentos que han de ser sometidos a un tratamiento con radiación ionizante, este Comité, en conformidad con las directrices ya establecidas por la Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria (AFSSA, 2006) aconseja que se sigan las líneas guía recogidas en el Anexo I.

Conclusiones del Comité Científico

La irradiación de materiales plásticos puede originar productos de radiólisis, volátiles y no volátiles, que pueden migrar a los alimentos y afectar a las características organolépticas y a la seguridad de los mismos.

En general, para los materiales que vayan a ser irradiados se debe disponer de datos experimentales que demuestren que tras el proceso de irradiación no se forman productos que puedan migrar a los alimentos y representar un riesgo para la salud humana.

Se recomiendan como directrices generales las establecidas en el Anexo I de este documento, para la elaboración de la documentación que permita evaluar la utilización segura de los materiales de envase irradiados.

Referencias

- AESAN (2004). Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia de la AESA, en relación con la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos. AESA-2003-004. Disponible en: http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/comite_cientifico/C.C_ionizantes.pdf
- AFSSA (2006). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Opinion of the French Food Safety Agency (Afssa) on the constitution of health risk assessment dossiers related to the use of plastic materials treated by ionizing radiation and intended for contact with foodstuffs: Guidelines. Mandate no 2004-SA-0209. Disponible en: <http://www.afssa.fr/Documents/MCDA2004sa0209EN.pdf>
- AFSSA (2007). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'emploi des matériaux et objets plastiques ionisés aux doses inférieures ou égales à 10 kGy et destinés au contact des denrées, produits et boissons destinées à l'alimentation: Recommandations. Saisine n° 2007-SA-0081. Disponible en: <http://www.afssa.fr/Documents/MCDA2007sa0081.pdf>
- Araújo, H.P., Félix, J.S., Manzoli, J.E., Padula, M. y Monteiro, M. (2008). Effects of g-irradiation on caprolactam level from multilayer PA-6 films for food packaging: Development and validation of a gas chromatographic method. *Radiation Physics and Chemistry*, 77, pp: 1039-1045. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2008.03.001>
- Arrete du 12 Aout (1986). Relatif au traitement par rayonnements ionisants des matériaux et objets mis ou destinés à être mis au contact des denrées, produits et boissons destinés à l'alimentation (modifié par Arrêté du 12

- août 1986). *Journal officiel de la République française* du 20 août 1986, p: 10111. Disponible en: http://www.legifrance.gouv.fr/jopdf/common/jo_pdf.jsp?numJO=0&dateJO=19860820&numTexte=&pageDebut=10111&pageFin=
- CDC (2005). Centers for Disease Control and Prevention. Food Irradiation. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/DBMD/diseaseinfo/foodirradiation.htm>
- CFR (2009a) Code of Federal Regulations. Title 21 Food and Drugs, Part 179-Food additives. Section 45 Packaging materials for use during the irradiation of prepackaged foods. Disponible en: <http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/get-cfr.cgi?TITL=21&PART=179&SECTION=45&TYPE=PDF>
- CFR (2009b) Code of Federal Regulations. Title 21 Food and Drugs, Part 170-Irradiation in the production, processing and handling of food. Section 39 Threshold of regulation for substances used in food-contact articles. Disponible en: <http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/getcfr.cgi?TITL=21&PART=170&SECTION=39&TYPE=PDF>
- Chytiri, S., Goulas, A.E., Badeka, A., Riganakos, K.A. y Kontominas, M.G. (2005). Volatile and non-volatile radiolysis products in irradiated multilayer coextruded food-packaging films containing a buried layer of recycled low-density polyethylene. *Food Additives and Contaminants*, 22 (12), pp: 1264-1273. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/02652030500241645>
- Chytiri, S., Goulas, A.E., Badeka, A., Riganakos, K.A., Petridis, D. y Kontominas, M.G. (2008). Determination of radiolysis products in gamma-irradiated multilayer barrier food packaging films containing a middle layer of recycled LDPE. *Radiation Physics and Chemistry*, 77, pp: 1039-1045. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2008.04.007>
- Codex Alimentarius (2003a). Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Tratamiento de los Alimentos por Irradiación (CAC/RCP 19-1979, Rev. 1-2003). Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=18
- Codex Alimentarius (2003b). Norma General del Codex para Alimentos Irradiados (CODEX STAN 106-1983, REV. 1-2003). Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=16
- Comunicación 2006/C112/05. Lista de los alimentos o ingredientes alimentarios que los Estados miembros autorizan a tratar con radiación ionizante (conforme al apartado 6 del artículo 4 de la Directiva 1999/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. DO C 112 de 12 de mayo de 2006, pp: 6-7. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2006:112:0006:0007:ES:PDF>
- Demertzis, P.G., Franz, R. y Welle, F. (1999). The Effects of γ -Irradiation on Compositional Changes in Plastic Packaging Films. *Packaging Technology and Science*, 12, pp: 119-130. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1522\(199905/06\)12:3<119::AID-PTS460>3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1522(199905/06)12:3<119::AID-PTS460>3.0.CO;2-G)
- Directiva 1999/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de febrero de 1999 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. DO L 066 de 13 de marzo de 1999, pp: 16-23.
- Directiva 1999/3/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de febrero de 1999, relativa al establecimiento de una lista comunitaria de alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. DO L 066 de 13 de marzo de 1999, pp: 24-25.
- EFSA (2008). European Food Safety Authority. Note for guidance for petitioners presenting an application for the safety assessment of a substance to be used in food contact materials prior to its authorisation. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/21r.pdf>
- FDA (2009a). Food and Drug Administration. Packaging Materials Listed in 21 CFR 179.45 for Use During Irradiation of Prepackaged Foods. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/IrradiatedFoodPackaging/ucm074764.htm>
- FDA (2009b). Threshold of Regulation Exemptions. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodContactSubstancesFCS/ucm093685.htm>

- Félix, J.S., Monteiro, M., Manzoli, J.E., Padula, M., Pezo, D., Romero, J. y Nerin, C. (2008). Identification and migration of degradation compounds from irradiation of multilayer polyamide 6 films for meat foodstuffs and cheese. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, pp: 847-857. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-1893-3>.
- Goulas, A.E., Riganakos, K.A. y Kontominas, M.G. (2003). Effect of ionizing radiation on physicochemical and mechanical properties of commercial multilayer coextruded flexible plastics packaging materials. *Radiation Physics and Chemistry*, 68, pp: 865-872. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-806X\(03\)00298-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-806X(03)00298-6)
- Haji-Saeida, M., Sampa, M.H.O. y Chmielewski, A.G. (2007) Radiation treatment for sterilization of packaging materials. *Radiation Physics and Chemistry*, 76, pp: 1535-1541. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2007.02.068>
- Health Canada (2002). Recommended Canadian Code of Practice for Food Irradiation. Health Canada, in collaboration with the Canadian Food Inspection Agency. Disponible en: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/securit/code_of_practice-code_de_pratique-eng.pdf
- IAEA (2009). Food Irradiation Clearances Database. Nucleus, For Nuclear Knowledge and Information. International Atomic Energy Agency. Disponible en: <http://nucleus.iaea.org/NUCLEUS/nucleus/apps/FICDB/DatabaseHome.html>
- ICGFI (1998). Irradiation and Trade in Food and Agricultural Products. International Consultative Group on Food Irradiation (ICGFI), Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. IAEA. Disponible en: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/fep/public/irrad.pdf>
- JECFI/IAEA (1999). Joint Expert Committee on Food Irradiation/International Atomic Energy Agency. Facts about Food Irradiation, International Atomic Energy Agency. Disponible en: <http://www.iaea.org/nafa/d5/public/foodirradiation.pdf>
- Jeon, D.H., Gun, Y.P., In, S.K., Kwang, H.L. y Hyun, J.P. (2007). Antioxidants and their migration into food stimulants on irradiated LLDPE film. *LWT. Food Science and Technology*, 40 (1), pp: 151-156. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2005.05.017>.
- Joint FAO/IAEA/WHO Study Group (1999). High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 KGy. WHO Technical Report Series, 890, Geneva 1999. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/irrad.pdf.
- Komolprasert, V.D., Bailey, A.D. y Machuga, E.D. (2008). Regulatory report :Irradiation of Food Packaging Materials. *Food Safety Magazine*, Dec 07/Jan 08. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/IrradiatedFoodPackaging/ucm110564.htm>
- Mizani, M., Sheikh, N., Samad, E., Abas, G. y Farnaz, A.T. (2009). Effect of gamma irradiation on physico-mechanical properties of spice packaging films. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, pp: 281-284. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.04.021>
- Morehouse, K.M. (2002). Food irradiation-US regulatory considerations. *Radiation Physics and Chemistry*, 78, pp: 806-809. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-806X\(01\)00514-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-806X(01)00514-X).
- Morehouse, K.M. y Komolprasert, V. (2004). Irradiation of Food and Packaging: An overview, chapter 1, 1-11. ACS Symposium Series, Volume 875. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/IrradiatedFoodPackaging/ucm081050.htm>
- Oliveira, M., Ortiz, A.V., Mastro, N.L. y Moura, E.A.B. (2009). The influence of electron-beam irradiation on some mechanical properties of commercial multilayer flexible packaging materials. *Radiation Physics and Chemistry*, 78, pp: 553-555. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.03.041>
- Paquette, K.E. (2004). Irradiation of Prepackaged Food: Evolution of the U.S. Food and Drug Administration's Regulation of the Packaging Materials, chapter 12, 182-202. ACS Symposium Series, Volume 875. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/IrradiatedFoodPackaging/ucm088992.htm>
- Park, G.Y., Chob, S.Y., Jeon, D.H., Kwak, I.S., Lee, K.H. y Park, H.J. (2006). Formation of monomer residues in PS, PC, PA-6 and PVC upon γ -irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 75, pp: 1055-1059. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2005.12.039>
- Pawde, S.M. y Deshmukh, K. (2008). Influence of irradiation on the properties of polyacrylonitrile films. *Journal of Applied Polymer Science*, 110, pp: 2569-2578. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/app.28761>

- Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo.
- Reglamento (CE) N° 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE. DO L 338 de 13 de noviembre de 2004, pp: 4-17.
- Riganakos, K.A., Koller, W.D., Ehlermann, D.A.E., Bauer, B. y Kontominasa, M.G. (1999) Effects of ionizing radiation on properties of monolayer and multilayer flexible food packaging materials. *Radiation Physics and Chemistry*, 54, pp: 527-540. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-806X\(98\)00263-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-806X(98)00263-1)
- Sadler, G., Chappas, W. y Pierce, D.E. (2001). Evaluation of e-beam, c- and X-ray treatment on the chemistry and safety of polymers used with pre-packaged irradiated foods: a review. *Food Additives and Contaminants*, 18 (6), pp: 475-501. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/02652030119263>
- SCF (1989). Scientific Committee on Food. Reports of the Scientific Committee for Food (Eighteenth series), Commission of the European Communities. Report EU 10840 EN. Disponible en : http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_18.pdf
- SCF (1994). Reports of the Scientific Committee for food (Thirty-second series), European Commission. Report EU 10840 EN. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_32.pdf
- SCF (1998). Opinion of the Scientific Committee on Food on the irradiation of eight foodstuffs. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out15_en.html.
- SCF (2003). Revision of the opinion of the Scientific Committee on Food on the irradiation of food (expressed on 4 April 2003). SCF/CS/NF/IRR/24 Final, 24 April 2003, European Commission. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out193_en.pdf
- Stoffers, N.H., Linssenb, J.P.H., Franz, R. y Wellea, F. (2004). Migration and sensory evaluation of irradiated polymers. *Radiation Physics and Chemistry*, 71, pp: 203-205. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2004.03.078>.
- Welle, F., Mauer, A. y Franz, R. (2002). Migration and sensory changes of packaging materials caused by ionising radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, pp: 841-844. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-806X\(01\)00576-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-806X(01)00576-X).

Directrices generales para la evaluación de la seguridad de los materiales en contacto con los alimentos que han de ser sometidos a un tratamiento con radicación ionizante

Preámbulo

Especificar:

- Objeto de la solicitud, nombre del material irradiado y condiciones de uso extremas (para que tipo de alimentos se va a utilizar, tiempo y temperatura del contacto).
- Tipo de envase (bandeja, *film* encogible, *film* sellante, etc.).

1. Descripción y certificados de la verificación periódica de la instalación

Cada certificado debe incluir el nombre y ubicación de la compañía que realiza la irradiación, así como la periodicidad de las verificaciones.

2. Información sobre el tipo, fuente, dosis y dosimetría de la radiación ionizante aplicada

Por ejemplo, irradiación con rayos *gamma* procedentes de radionucleidos ^{60}Co , dosis absorbida 10 kGy, tasa de dosis 50 Gy/min.

3. Justificación técnica del tratamiento

4. Composición del material antes del tratamiento

Todos los monómeros y aditivos utilizados en la fabricación del material tienen que estar autorizados. Un material puede estar formado por varias capas y cada una de ellas hecha con uno o más monómeros y aditivos.

4.1 Descripción general del material: polímeros y capas (en el caso de multicapas)

Tabla 1. Ejemplo de descripción de las capas de un material						
Nº de capas	Nombre comercial de polímeros y aditivos utilizados en las capas		Nombre químico de polímeros y aditivos utilizados en las capas	Espesor (µm)	% en peso	
1				12	25 (% del material)	
Polímeros	1a	Polímero a	Polietileno de baja densidad		50 (% capa 1)	
	1b	Polímero b	Copolímero de etileno y acetato de vinilo		10	
	1c	Polímero c	x		20	
Aditivos añadidos	1d	Aditivo d	x		10	
	1e	Aditivo e	x		10	
2				x	75	
Polímeros	2a	x	x		x	
	2b	x	x		x	
Aditivos añadidos	2c	x	x		x	
	2d	x	x		x	
Total				Espesor del material	100% del material	

4.2 Descripción del proceso de fabricación del material

4.3 Propiedades del material sometido al tratamiento, particularmente espesor y peso

4.4 Tipo de monómero con sus referencias regulatorias, número CAS (*Chemical Abstracts Service*) y número de referencia CEE del material del embalaje

Las restricciones y/o especificaciones (cantidad máxima permitida de la sustancia «residual» en el material y objeto, límite de migración específico, etc. debe estar declarada en los certificados de los suministradores.

Tabla 2. Ejemplo de descripción de monómeros de un material destinado a ser tratado con radiaciones ionizantes						
Nº de capa	Nombre del polímero	Monómeros	Nº CAS	Nº Ref. CEE	Restricciones CM, LME, etc.	Legislación
1						
1a	Polietileno	Monómero 1				
1b		Monómero 2				
	etc.					
2						
2a						
2b						
	etc.					

4.5 Tipo de aditivo con sus referencias legislativas, número CAS y número de referencia CEE

El contenido máximo de aditivo debe especificarse para cada uno de los polímeros que constituyen las capas. Cualquier otro aditivo incorporado en el material también debe ser especificado.

Tabla 3. Ejemplo de descripción de aditivos de un material destinado a ser tratado con radiaciones ionizantes

Nº de capa	Nombre del polímero	Aditivos	Nº CAS	Nº Ref. CEE	Concentración	Restricciones CM, LME, etc.	Legislación
1							
1a	Polietileno	Antioxidante					
1b		Lubricante					
	etc.						
2							
2a							
2b							
	etc.						

5. Estudio del carácter inerte del material después del tratamiento

Debe realizarse un estudio detallado que incluya:

- Protocolos.
- Elementos de validación del método analítico.
 - Químicos: límites de detección y cuantificación, especificaciones, datos de calibración.
 - Sensoriales: significación estadística de los resultados.
- Cromatogramas y/o espectros.
- Referencia a las normas utilizadas.

Las condiciones de los ensayos de migración deben ajustarse a las normas básicas para la verificación global y específica de la migración (Real Decreto 866/2008 y modificaciones).

5.1 Migración global

5.2 Migración específica de monómeros y aditivos

5.3 Posibles productos de degradación generados por el tratamiento con las radiaciones ionizantes

5.3.1 Formación de productos de radiólisis

Basados en estudios científicos realizados sobre materiales similares y por comparación de los análisis realizados antes y después del tratamiento.

5.3.2 Si un producto de radiólisis, que no sea una sustancia especificada en 4.4 o 4.5, es detectado, debe identificarse y comprobarse si se trata de una sustancia autorizada

- Si está autorizada debe indicarse la referencia legislativa y verificar que cumple con las restricciones especificadas si las tuviere.

- Si no está autorizada se realizarán los ensayos de migración específica (5.3.4) y un estudio toxicológico (5.3.5).

5.3.3 Extracción, identificación y cuantificación de los productos de radiólisis en el material

Deben utilizarse metodologías analíticas apropiadas para la determinación de sustancias volátiles, semivolátiles y no volátiles, por ejemplo, los siguientes procedimientos:

- *Extracción.* Técnicas de extracción con disolventes para sustancias volátiles y no volátiles, utilizando solventes tanto polares como no polares apropiados a la naturaleza del polímero. Técnicas de extracción por espacio de cabeza dinámico o microextracción en fase sólida para sustancias volátiles.
- *Identificación.* Utilizando todos los medios necesarios para conseguir la misma, particularmente la cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de masas.
- *Cuantificación.* Si se dispone de patrones deben utilizarse indicando la pureza de los mismos. En ausencia de patrones pueden utilizarse sustancias estructuralmente similares que puedan dar una respuesta parecida al producto de radiólisis con la técnica de medida utilizada.

5.3.4 Migración en simulantes de alimentos

Se estimará o medirá según el punto 5.2.

5.3.5 Información toxicológica

Referidos a la sustancia cuando migra en la misma forma química y a sus productos de descomposición o de transformación o de reacción cuando son estos los que migran a los alimentos. Se realizará en conformidad con las líneas guía establecidas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008).

Conjunto básico de pruebas

- Tres estudios de mutagenicidad *in vitro*.
- Un test para inducción de mutación de genes en bacterias.
- Un test para inducción de mutación de genes en células de mamífero.
- Un test para inducción de aberraciones cromosómicas en células de mamífero.
- Estudios de toxicidad oral a 90 días, normalmente en dos especies.
- Estudios de absorción, distribución, metabolismo y excreción.
- Estudios de toxicidad reproductiva en una especie y toxicidad del desarrollo en dos especies.
- Estudios sobre toxicidad/carcinogenicidad a largo plazo, normalmente en dos especies.

Bajo ciertas condiciones se puede requerir únicamente un conjunto básico reducido de pruebas.

Conjunto básico reducido de pruebas

- Cuando la migración está en el rango de 0,05-5 mg/kg de alimento o simulante de alimento las pruebas que se requieren son:

- La tres pruebas de mutagenicidad indicadas en el conjunto básico de pruebas.
- Estudios de toxicidad oral a 90 días.
- Datos que demuestren la ausencia de potencial de acumulación en el hombre.
- Si la migración es inferior a 0,05 mg/kg de alimento o simulante de alimento las pruebas que se requieren son:
 - La tres pruebas de mutagenicidad indicadas en el conjunto básico de pruebas.

Cuando por consideraciones estructurales, por conocimiento previo o porque los estudios anteriormente realizados indiquen que son posibles otros efectos biológicos (como por ejemplo: neurotoxicidad, inmunotoxicidad, proliferación peroxisomal, etc.) se pueden requerir estudios adicionales. Se contemplan también posibles modificaciones de las pruebas empleadas para la evaluación de sustancias hidrolizables, aditivos poliméricos, ingredientes o aditivos alimentarios y sustancias antimicrobianas.

5.4 Efectos organolépticos

Se realizaran pruebas de la posible transferencia de olores al alimento. Debe describirse cualquier olor detectado con posterioridad al tratamiento con radiaciones ionizante, especificando su origen cuando sea posible (por ejemplo: olor a ácido acético después de irradiar acetato de polivinilo, etc.).

6. Otra información

Cualquier otra información que se considere de interés para la evaluación de la seguridad.

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

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

Abreviatura revista: Rev. Com. Cient. AESAN.



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE SANIDAD
Y POLÍTICA SOCIAL



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición