

revista del  
**Comité**  
**Científico** de la aesan

**Nº 28**

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





Revista del Comité Científico de la AESAN

Madrid, 2018



revista del  
**Comité**  
**Científico** de la aesan

**Nº 28**

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

de bibliografía científica internacionalmente aceptadas. De ello se deriva, entre otras, la necesidad de abordar su estudio e interpretación desde la consideración ineludible de las citas bibliográficas referenciadas en el texto y enumeradas en el apartado "Referencias" que incluye al final de los infor-

mes. Lo contrario, además de dificultar su comprensión integral, pudiera llevar a extraer, conclusiones parciales o equivocadas, divergentes del informe en su conjunto.

### **Consejo Editorial Científico**

#### **Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición**

##### **Presidente**

Gaspar Ros Berrueto

##### **Vicepresidenta**

Ángeles Jos Gallego

Montaña Cámara Hurtado

María Pilar Conchello Moreno

Álvaro Daschner

Ramón Estruch Riba

Rosa María Giner Pons

María Elena González Fandos

Susana Guix Arnau

Jordi Mañes Vinuesa

Olga Martín Beloso

María Aránzazu Martínez Caballero

José Alfredo Martínez Hernández

Alfredo Palop Gómez

David Rodríguez Lázaro

Carmen Rubio Armendáriz

María José Ruiz Leal

Jesús Ángel Santos Buelga

Pau Talens Oliag

Josep Antoni Tur Marí

##### **Secretario técnico**

Vicente Calderón Pascual

##### **Coordinador de la edición**

Ricardo López Rodríguez

##### **Edita**

AESAN

Alcalá, 56. 28071. Madrid

Correo electrónico: [evaluacionriesgos@mscbs.es](mailto:evaluacionriesgos@mscbs.es)

##### **Diseño y maquetación**

Advantia Comunicación Gráfica, S.A.

**NIPO: 690-16-003-8**

**ISSN: 2605-0617**

## Índice

|  |     |
|--|-----|
| Prólogo  | 9   |
| Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la prospección de peligros biológicos de interés en seguridad alimentaria en España                      | 11  |
| Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la prospección de peligros químicos de interés en seguridad alimentaria en España                        | 69  |
| Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el riesgo asociado a la presencia de alcaloides de la pirrolizidina en polen destinado al consumo humano | 127 |
| <b>Colaboraciones</b>  |     |
| Balance de 15 años del Comité Científico como órgano de evaluación de riesgos alimentarios de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición   | 141 |



Tengo la satisfacción de presentar el número veintiocho de la Revista del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

Este año se han cumplido quince años de la constitución del Comité Científico, por el que han pasado más de 70 científicos de la máxima competencia científica de diversas Universidades y Organismos de investigación que han aprobado más de 100 informes sobre gran variedad de riesgos alimentarios. Se trata de opiniones científicas que son la base para la toma de decisiones de gestión y que incluyen desde revisiones de cuestiones de interés a evaluaciones de riesgos, líneas directrices y evaluaciones de dosieres de distintos productos alimenticios tales como coadyuvantes tecnológicos o nuevos alimentos.

Mantener de forma constante esta actividad es de gran importancia y trascendencia para garantizar la promoción de la seguridad alimentaria y la salud de los consumidores y esta constancia se materializa gracias al compromiso de todos los miembros del Comité. Quiero recordar que el Comité Científico de la AESAN es un órgano evaluador independiente y sus opiniones son el producto de la experiencia y conocimiento de sus miembros. La publicación de sus informes a través de esta Revista contribuye a divulgar sus opiniones y su trabajo, y a una mayor transparencia en el proceso de análisis del riesgo.

En este número de la Revista del Comité Científico se incluyen dos informes sobre propuestas de estudios prospectivos de peligros químicos y biológicos y uno sobre los alcaloides de la pirrolizidina. Estoy segura que estos informes nos ayudarán a tomar medidas que aumenten la seguridad alimentaria de los consumidores.

Finalmente, quiero recordar y agradecer a todos los científicos que han formado parte del Comité Científico desde su creación, nombrando a sus cinco Presidentes, Andreu Palou, Rosaura Farré, Emilio Martínez de Victoria, Guillermina Font y Gaspar Ros.

Gracias a todos ellos, por contribuir al éxito cosechado en estos quince años.

Marta García Pérez

*Directora Ejecutiva de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición  
Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social*



# Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la prospección de peligros biológicos de interés en seguridad alimentaria en España

## Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Montaña Cámara Hurtado, María Pilar Conchello Moreno, Álvaro Daschner, Ramón Estruch Riba, Rosa María Giner Pons, María Elena González Fandos, Susana Guix Arnau, Ángeles Jos Gallego, Jordi Mañes Vinuesa, Olga Martín Beloso, María Aránzazu Martínez Caballero, José Alfredo Martínez Hernández, Alfredo Palop Gómez, David Rodríguez Lázaro, Gaspar Ros Berruezo, Carmen Rubio Armendáriz, María José Ruiz Leal, Jesús Ángel Santos Buelga, Pau Talens Oliag, Josep Antoni Tur Marí

## Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2018-004

Documento aprobado por la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico en su sesión plenaria de 28 de noviembre de 2018

## Grupo de trabajo

Jesús Ángel Santos Buelga (Coordinador)  
Rosa María Giner Pons  
María Elena González Fandos  
Susana Guix Arnau  
Alfredo Palop Gómez  
David Rodríguez Lázaro

## Resumen

Existen peligros de interés en seguridad alimentaria para los que no existe una regulación específica que pueden ser objeto de programas de prospección con el fin de obtener datos que permitan realizar una evaluación del riesgo.

El Comité Científico ha revisado e identificado algunos peligros biológicos, señalando aquellos alimentos o condiciones que, a priori, podrían implicar un mayor riesgo para el consumidor. La relación de peligros que se abordan en este informe no pretende ser exhaustiva, ya que no contempla todos los posibles peligros biológicos novedosos y su enfoque es el de servir de punto de partida para la posible realización de estudios prospectivos con los que obtener datos de su presencia en distintos alimentos.

La propuesta incluye virus, bacterias y parásitos:

- Virus de transmisión alimentaria: Norovirus, virus de la Hepatitis A y virus de la Hepatitis E en moluscos bivalvos y vegetales frescos, y virus de la Hepatitis E en productos derivados de carne de cerdo.
- Bacterias: *Yersinia enterocolitica* en carne de porcino, *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en productos de la pesca y moluscos bivalvos, *E. coli* (patotipos no STEC) en vegetales frescos, y *Clostridium difficile* en carne fresca.
- Parásitos: protozoos (*Toxoplasma* y *Cryptosporidium*) en carne fresca y vegetales frescos.

En el informe se han descrito las metodologías disponibles para su detección en muestras alimentarias, se han identificado lagunas en el conocimiento de estos peligros que pueden ser el punto de partida para promover actividades de investigación encaminadas a mejorar el conocimiento de los mismos y se ha incluido información sobre las posibilidades de control de la transmisión de los microorganismos a través de la cadena alimentaria.

## Palabras clave

Peligros biológicos, estudios prospectivos, Norovirus, virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis E, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*.

# Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the prospection of biological hazards of interest in food safety in Spain

## Abstract

In food safety, there are hazards of interest for which no specific regulation exists that may be the subject of survey programmes in order to obtain data to carry out a risk assessment.

The Scientific Committee has reviewed and identified some biological hazards, indicating which of those foods or conditions that, a priori, may involve a greater risk to consumers. The list of hazards addressed in this report is not intended to be comprehensive, given that it does not take into account new possible biological hazards. It is meant to serve as a starting point for possible prospective studies with which data will be obtained regarding the presence of these hazards in different foods.

The proposal includes viruses, bacteria and parasites:

- Foodborne viruses: Norovirus, Hepatitis A virus, and Hepatitis E virus in bivalve molluscs and fresh vegetables and Hepatitis E virus in pork meat products.
- Bacteria: *Yersinia enterocolitica* in pork meat, *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in bivalve molluscs and fish products, *E. coli* (non-STEC pathotypes) in fresh vegetables and *Clostridium difficile* in fresh meat.
- Protozoan Parasites: *Toxoplasma* and *Cryptosporidium* in fresh meat and vegetables.

The report details the methodologies available to detect them in food samples, and the gaps in our knowledge of these hazards, which may be a starting point to promote research activities aimed at improving our knowledge about them. The report also includes information about the possible ways to control the transmission of these microorganisms through the food chain.

## Key words

Biological hazards, prospective studies, Norovirus, hepatitis A virus, hepatitis E virus, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*.

## 1. Introducción

A lo largo de la cadena alimentaria pueden estar presentes, incorporarse o producirse distintos peligros de tipo químico o biológico que pueden suponer un riesgo para el consumidor.

Los programas de control oficial tratan de garantizar la realización de controles de los peligros de interés en seguridad alimentaria en función del riesgo pero sólo afectan a aquellos parámetros con límites máximos fijados en determinados alimentos.

Sin embargo, existen otros peligros de interés en seguridad alimentaria para los que no existe una regulación específica, o existe pero sólo en determinados alimentos, que pueden ser objeto de programas de prospección con el fin de obtener datos que, además de proteger al consumidor de una exposición puntual a un peligro, permitan realizar una evaluación del riesgo.

Por otro lado, la identificación de nuevos peligros para los que puede producirse una exposición significativa, o la evaluación del riesgo derivado de una exposición o susceptibilidad nuevas o incrementadas significativamente a un peligro conocido es importante, no solo a efectos de un eventual control de estos peligros emergentes, sino también de promover la investigación y mejorar su conocimiento por parte de los consumidores y de la comunidad científica.

Por ello, se ha solicitado a la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) que realice una revisión de los peligros de mayor interés en seguridad alimentaria en España que no cuenten con una regulación específica, identificándolos y señalando aquellos alimentos o condiciones que, a priori, podrían implicar un mayor riesgo para el consumidor con el fin de realizar, eventualmente, estudios prospectivos.

## 2. Peligros biológicos

Se han contemplado los siguientes microorganismos:

- Virus de transmisión alimentaria:
  - Norovirus, virus de la Hepatitis A y virus de la Hepatitis E en moluscos bivalvos y vegetales frescos.
  - Virus de la hepatitis E en productos derivados de carne de cerdo.
- Bacterias
  - *Yersinia enterocolitica* en carne de porcino.
  - *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en productos de la pesca y moluscos bivalvos.
  - *E. coli* (patotipos no STEC) en vegetales frescos.
  - *Clostridium difficile* en carne fresca.
- Parásitos
  - Protozoos (*Toxoplasma* y *Cryptosporidium*) en carne fresca y vegetales frescos.

## **2.1 Virus de transmisión alimentaria (Norovirus, Hepatitis A y Hepatitis E) en moluscos bivalvos, vegetales frescos y productos derivados de carne de cerdo**

### **2.1.1 Información general**

Los virus que pueden llegar a contaminar agua y alimentos y transmitir enfermedades a nuevos individuos son numerosos y diversos. Pertenecen a diversas familias y pueden causar distintas patologías, desde gastroenteritis agudas, normalmente leves, a hepatitis, e incluso miocarditis o infecciones neurológicas graves, como meningitis o encefalitis aséptica (Bosch et al., 2016). A pesar de esta diversidad, los virus entéricos humanos más relevantes en el ámbito de la seguridad alimentaria, son los norovirus humanos (NoV), causantes de gastroenteritis, y el virus de la hepatitis A (HAV), la principal causa de hepatitis aguda a nivel mundial. Además, recientemente se ha señalado la importancia del virus de la hepatitis E (HEV) que también causa cuadros de hepatitis agudas y que en determinados individuos puede evolucionar a hepatitis crónica con complicaciones graves (EFSA, 2011). En tanto que virus entéricos, todos ellos se propagan principalmente a través de la vía fecal-oral.

En los últimos años, la incidencia de brotes de transmisión alimentaria causados por NoV y HAV ha experimentado un aumento considerable en países desarrollados, y se han asociado principalmente al consumo de moluscos bivalvos, hortalizas de hoja verde y frutos tipo baya, así como a comidas preparadas. En el caso de HEV, además de estas matrices, cabría añadirse también los productos derivados del cerdo crudos o poco cocinados, pues este animal es su principal reservorio. Finalmente, a pesar de que la contaminación vírica puede producirse durante la fase pre-cosecha, también es frecuente que los alimentos listos para comer se contaminen durante la preparación por parte de un manipulador infectado.

### **2.1.2 Características generales e impacto**

Los NoV presentan una distribución geográfica mundial y causan gastroenteritis esporádica o epidémica en todos los grupos de edad. Se subdividen en siete genogrupos, de los cuales los genogrupos I, II y IV afectan a humanos. De estos tres, el genogrupo II es el más prevalente, seguido por el genogrupo I; el genogrupo IV por el momento se ha detectado con una frecuencia muy baja. A su vez, cada genogrupo puede subdividirse en base a la variabilidad genética en distintos genotipos. De los más de 40 genotipos existentes en total, el genotipo GII.4 ha sido el más prevalente desde finales de la década de los 80.

Actualmente se consideran los agentes causantes del 18 % del total de infecciones causadas por patógenos de transmisión alimentaria a nivel mundial, las cuales ascienden a 600 millones de casos cada año (Lopman et al., 2016). A nivel Europeo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que NoV causa anualmente alrededor de 15 millones de casos (y 400 muertes). Los brotes epidémicos son muy frecuentes, en especial en la restauración y en instituciones cerradas o semi-cerradas, y de todas las infecciones, se atribuye un origen alimentario a aproximadamente el 17 % (95 % IC 16-47) de ellas (Havelaar et al., 2008). Algunos estudios económicos de nuestro país indican que los costes directos e indirectos de un brote de NoV oscilan entre los 3 500-4 800 € (Navas et

al., 2015). A nivel europeo, a pesar de que la monitorización de NoV no está armonizada en los distintos países, NoV causó en 2015 y 2016 el 8-9 % de los brotes de origen alimentario, por detrás de *Salmonella*, toxinas bacterianas y *Campylobacter* (EFSA, 2016b, 2017b). Datos de Cataluña indican que NoV se diagnosticó como causante de 128 brotes de gastroenteritis aguda entre 2010-2012, el 47 % de los cuales fueron de origen alimentario, siendo los moluscos bivalvos (ostras, mejillones o almejas) el alimento contaminado en el 18 % de los brotes (Sabria et al., 2014). En Europa en 2015, los alimentos clasificados en la categoría de "crustáceos, marisco, moluscos y productos derivados" causaron el 27,8 % de los brotes de NoV, y las frutas y vegetales provocaron el 11 % (EFSA, 2016b). El mayor brote alimentario documentado de NoV se produjo en diversas escuelas en Alemania en 2012 por el consumo de fresas congeladas importadas de China, y afectó a casi 11 000 individuos. Desde entonces, la Comisión Europea exige que el 5 % de las fresas congeladas importadas de China sean analizadas para NoV y HAV (UE, 2012). En 2016, se produjo en España el mayor brote por NoV causado por agua embotellada procedente de un manantial en Andorra, que afectó a más de 4 100 personas, y puso de manifiesto que los controles bacteriológicos pueden no ser suficientes para garantizar la seguridad de ciertos productos.

A diferencia de NoV, el HAV presenta una marcada distribución geográfica. Mientras que en los países en vías de desarrollo la mayoría de individuos se infectan durante los primeros 5 años de vida y padecen una infección subclínica, en los países industrializados los individuos llegan a adultos sin haber estado expuestos al virus y, en caso de contraer la infección, cursa con sintomatología y puede ser especialmente grave en mayores de 60 años. Aunque no cronifica, se han descrito hepatitis fulminantes en 2 de cada 1 000 casos. Aunque únicamente se conoce la existencia de un serotipo, en base a la variabilidad genética, se distinguen seis genotipos de HAV. Los genotipos I, II y III afectan a humanos y a su vez se subdividen en subgenotipos (IA, IB, IC, IIA, IIB, IIIA y IIIB). En España, la infección por HAV es de declaración obligatoria y en los últimos años se han reportado 543 casos en 2015, 742 casos en 2016 y 3 988 casos en 2017. En comparación con NoV, se estima que el porcentaje de casos de HAV que tendrían un origen alimentario es menor, atribuyéndose ese origen en un 4 % de las infecciones. A pesar de que existe una vacuna efectiva para HAV y de que muchos países la incluyen en su calendario de vacunación sistemática, en España únicamente se vacuna a todos los niños en Cataluña desde 1998, y en Ceuta y Melilla desde el año 2000. En el resto del territorio, se dirige de forma selectiva a grupos con un mayor riesgo.

Debido a que el nivel de endemicidad en la región europea es extremadamente bajo, el porcentaje de población adulta no inmunizada y susceptible a la infección es elevado. En los últimos años, se han producido brotes de elevada magnitud tanto en número de casos como en impacto territorial, en algunos casos por consumo de alimentos contaminados, aunque también ha habido brotes relevantes entre hombres MSM (*men-having sex-with-men*). En 2013, dos brotes causaron más de 250 casos en diferentes países nórdicos de Europa y en distintos estados de Estados Unidos por el consumo de fresas congeladas importadas de Egipto o de semillas de granada importadas de Turquía, respectivamente y durante 2013-14, se declararon más de 1 300 casos en 11 países europeos, asociados al consumo de fresas congeladas producidas en Europa.

Finalmente, a pesar de que el número de casos diagnosticados en Europa de HEV es relativamente bajo, los datos de seroprevalencia de algunos países europeos sugieren la existencia de numerosas infecciones subclínicas y/o la falta de vigilancia. La seroprevalencia oscila entre el 2-20 % en la mayoría de países europeos que han reportado datos, incluido España (Domanovic et al., 2017), aunque algunos estudios indican valores superiores al 70 % en determinadas regiones del sur de Francia (Mansuy et al., 2015). En Europa, el número de casos declarados se multiplicó por 10 entre 2005 y 2015, con 5 617 casos en 2015 (EFSA, 2017b). De los cuatro genotipos que pueden infectar humanos, los genotipos 1 y 2 son endémicos y asociados a brotes de transmisión hídrica, y los genotipos 3 y 4 se asocian a infecciones zoonóticas transmitidas por consumo de productos derivados del cerdo u otros animales de caza crudos o poco cocinados, por el consumo de otros alimentos contaminados y por el contacto con animales infectados.

Las principales medidas de control y prevención de las infecciones víricas transmitidas por alimentos deben reforzarse a lo largo de toda la cadena alimentaria (EFSA, 2011). En la producción primaria en agricultura, es importante controlar la calidad de las aguas de riego, del agua de lavado, el origen y calidad de abonos y fertilizantes naturales, y la higiene de las instalaciones. Asimismo, los criadores de moluscos deben velar por la calidad de las aguas de las zonas de cultivo. Para el caso de HEV, estrategias encaminadas a disminuir su prevalencia en cerdos pueden ser consideradas para reducir el riesgo de transmisión a humanos. La correcta y rigurosa higiene por parte de trabajadores de la cadena alimentaria es crucial a fin de impedir la transmisión de cualquier virus a los alimentos o su propagación por las instalaciones y superficies. En el caso de manipuladores de alimentos con gastroenteritis, se recomienda reincorporarse al trabajo solo después de haber transcurrido un período sin síntomas de diarrea y vómitos (por ejemplo, 48 horas), y para el caso de hepatitis, solo una vez los síntomas de ictericia hayan desaparecido y se haya realizado un examen médico para descartar el carácter contagioso. No obstante, cabe reconocer que el número de infecciones asintomáticas puede ser considerable, por lo que es importante maximizar las prácticas de higiene en todo momento. La higiene de manos y de las superficies también son medidas cruciales para prevenir la contaminación en el ámbito doméstico. Finalmente, las directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de virus (FAO, 2012) recomiendan realizar procesos de cocción que permitan alcanzar una temperatura interna del alimento de 90 °C durante 90 segundos, en especial en bivalvos (EFSA, 2015). La congelación no es una medida adecuada para minimizar la contaminación vírica de alimentos. El lavado de vegetales y hortalizas en presencia de algún desinfectante puede reducir en 1 o 2 logaritmos el nivel de virus respecto al lavado con agua sola, siendo el cloro y el ácido peracético algunos de los productos mejor caracterizados (EFSA, 2011) (Bosch et al., 2018).

### 2.1.3 Datos de prevalencia en los alimentos de mayor riesgo

La metodología disponible se ha utilizado ampliamente en laboratorios de investigación para conocer la prevalencia de contaminación, sobre todo de NoV (genogrupos I y II) y del HAV en las muestras alimentarias de riesgo que podrían llegar al consumidor.

### 2.1.3.1 NoV, HAV y HEV en moluscos bivalvos

La mayoría de estudios son cualitativos y reportan tasas de positividad para NoV en diferentes especies de bivalvos del 25-76 % en países europeos como España, Italia, Reino Unido, Irlanda, Polonia o Bélgica, o algo inferiores (9-22 %) en Francia. Aunque raramente se detecta el HAV en moluscos bivalvos producido en zonas no endémicas, existen estudios que reportan porcentajes de muestras positivas de hasta el 10 o 23 % en países como España o Italia, respectivamente (AESAN, 2011) (Romalde et al., 2017).

Para HEV, estudios recientes indican tasas de prevalencia de HEV en bivalvos producidos en Europa entre el 4-15 %, algunas de las más altas en mejillones españoles, aunque también se han reportado tasas del 0 % (Mesquita et al., 2016) (EFSA, 2017a).

### 2.1.3.2 NoV, HAV y HEV en vegetales frescos

Los datos obtenidos a partir de brotes identifican los frutos tipo baya y los vegetales de hoja listos para el consumo como los alimentos de mayor riesgo. Entre 2004-2012, los primeros fueron los responsables de más de la mitad de brotes de NoV causados por vegetales, tanto en Europa como en Estados Unidos (Callejón et al., 2015).

A pesar de que el número de estudios es todavía limitado, la prevalencia de NoV, HAV y HEV en productos vegetales listos para el consumo, mayoritariamente lechugas, reportada en países europeos es baja, de entre el 0-2 % (Kokkinos et al., 2012) (Losio et al., 2015) (Terio et al., 2017). No obstante, en muestreos anteriores también se reportan prevalencias de NoV marcadamente elevadas, que pueden oscilar entre el 12-54 % para hortalizas de hoja y el 6-34 % para frutos del bosque (Mattison et al., 2010) (Baert et al., 2011) (Loutreul et al., 2014).

### 2.1.3.3 HEV en productos derivados de cerdo

El virus de la hepatitis E ha sido detectado en productos de carne de cerdo (hígado, salchichas) vendidos al por menor, en varios países incluyendo países europeos como España, Francia, Italia, la República Checa, o el Reino Unido. Se han documentado tasas de detección del ARN del virus de 6,5 %, 4,0 % y 6,0 % para hígado de cerdo comercialmente disponible, aunque un estudio todavía no publicado en el marco del proyecto de investigación RTA2014-00024-C04 «Análisis y control integrado de *Toxoplasma gondii* y virus entéricos en la cadena alimentaria» en un número representativo de mataderos en España eleva ese porcentaje por encima del 20 %. En embutidos de hígado de cerdo y embutidos crudos procedentes de Alemania, se han descrito tasas de detección del ARN de HEV entre el 20 y el 22 %. Especialmente tasas de detección elevadas del 57,1-58,3 % han sido descritas para una salchicha de hígado local de Francia llamada «Figaretelli».

## 2.1.4 Metodologías disponibles

Desde 2013, se dispone de métodos estandarizados y validados para la detección cualitativa y cuantitativa de NoV (GI y GII) y HAV en las matrices alimentarias de mayor riesgo, en fómites, y en agua embotellada (ISO, 2013, 2017). El método estandarizado disponible está basado en detección molecular, incluye diversos controles para garantizar la ausencia total de posibles falsos negativos y ello hace que los análisis sean extremadamente sensibles, pero tengan un coste económico ele-

vado. Otra limitación importante es que, al tratarse de un método molecular, el resultado positivo no permite confirmar la infectividad del virus detectado.

Utilizando esta metodología, en 2017, NoV fue el agente identificado en el 29 % y 28 % de las alertas notificadas al sistema RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) en la categoría de frutos y vegetales (mayoritariamente frutos tipo baya congelados), y moluscos bivalvos (mayoritariamente ostras vivas u otros bivalvos congelados), respectivamente; para HAV se notificaron dos alertas en almejas vivas. En años anteriores, también se notificaron alertas de contaminación por NoV y HAV en bivalvos cocidos, aunque debido a que el método no permite confirmar que los virus detectados son infecciosos, el significado de estos resultados es todavía incierto.

Para el HEV, todavía hoy en día no se dispone de ningún método estandarizado, aunque su desarrollo ha sido señalado por EFSA como uno de los aspectos prioritarios en el campo de la seguridad virológica de alimentos para un futuro inmediato (EFSA, 2016c).

### 2.1.5 Pasos futuros

A pesar de que es necesario llevar a cabo más investigaciones y acumular más datos para establecer claramente la relación entre la detección del genoma de estos virus en alimentos y el riesgo para la salud, la posibilidad de establecer una normativa para NoV y/o HAV en alguna de las matrices alimentarias, en especial en moluscos bivalvos, está siendo considerada. Mientras que existe bastante consenso en que para HAV se debería exigir un resultado negativo debido a la mayor gravedad de la infección, para NoV probablemente se consideraría un nivel máximo de contaminación aceptable, todavía por determinar.

Puesto que en todos los países europeos se ha detectado una prevalencia elevada de NoV en los bivalvos analizados, un estándar basado en la ausencia de NoV tendría un fuerte impacto generalizado sobre los sectores productores. Según los datos publicados en la opinión científica de EFSA (2012), por ejemplo, si se estableciera un límite máximo de contaminación de 100 copias genómicas/g de tejido digestivo, habría un 33 % de las ostras francesas y un 65 % de las ostras inglesas que no pasarían el control. También en este sentido, EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) inició en 2016 un estudio prospectivo coordinado a nivel europeo para conocer con mayor precisión la prevalencia de NoV en ostras vivas (EFSA, 2016a). Aparte de estos avances, también es prioritario poder desarrollar métodos que permitan evaluar la infectividad de estos virus cuando se detectan en alimentos y poder establecer una correlación entre su detección y el riesgo que representan sobre la salud del consumidor (EFSA, 2016c).

Para las otras matrices de riesgo, en especial para los frutos tipo baya frescos o congelados y los vegetales listos para el consumo, también es prioritario acumular más datos para determinar la frecuencia y el nivel de contaminación en nuestro territorio. Puesto que se dispone de las herramientas, y debido a que recientemente se han producido brotes de HAV en España, sería recomendable realizar estos estudios prospectivos de forma cuantitativa e incluyendo tanto NoV como HAV.

Para HEV, la prioridad actualmente se centra por un lado en el desarrollo de métodos estandarizados de referencia para matrices alimentarias de interés, en especial la carne y sus productos derivados, y por otro conocer el impacto de las infecciones por HEV en Europa (EFSA, 2016c).

## 2.2 Bacterias

### 2.2.1 *Yersinia enterocolitica* en carne de porcino

#### 2.2.1.1 Información general

*Yersinia enterocolitica* es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza que puede producir infecciones en el ser humano ocasionando la enfermedad denominada yersiniosis. *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica* y *Campylobacter* spp. son los tres peligros más frecuentemente involucrados en enfermedades de transmisión alimentaria por consumo de carne de porcino (Fosse et al., 2009). El principal vehículo de transmisión de *Y. enterocolitica* al ser humano es la carne de cerdo y derivados crudos o insuficientemente cocinados (Huovinen et al., 2010).

#### 2.2.1.2 Características generales e impacto

*Y. enterocolitica* es una bacteria Gram negativa, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Es una bacteria psicrótrofa (crece a temperaturas de refrigeración), anaerobia facultativa (puede crecer tanto en alimentos envasados en oxígeno como en atmósfera modificada), además crece en un amplio rango de pH (4-10). Esta bacteria permanece viable a temperatura de congelación, sobreviviendo largos periodos de tiempo en alimentos congelados (Montville et al., 2012).

*Y. enterocolitica* es sensible al tratamiento térmico, se destruye con un tratamiento de 71,8 °C (Montville et al., 2012). Por ello, es importante alcanzar temperaturas de 70 °C en la preparación de la carne de porcino.

Existen seis biotipos de *Y. enterocolitica*: 1A, 1B, 2, 3, 4 y 5. Los biotipos 1B, 2, 3, 4 y 5 se consideran patógenos para el ser humano y animales. Las cepas del biotipo 1A se consideran no patógenas, aunque pueden tener potencial patógeno, de hecho algunos brotes ocasionados por *Y. enterocolitica* se han asociado con el biotipo 1A (Batzilla et al., 2011) (Sabina et al., 2011).

La patogenicidad de *Y. enterocolitica* se asocia con la presencia de factores de virulencia codificados tanto en un plásmido como en el cromosoma. Los biotipos patógenos (1B, 2, 3, 4 y 5) poseen el plásmido pYV (*Yersinia* Virulence), de 70 kb, que contiene genes que codifican factores de patogenicidad y esencial para su virulencia. El gen *yadA* codifica la proteína YadA (*Yersinia* Adhesin A) que permite la adhesión e invasión de células. El gen *yop* codifica la producción de proteínas Yop (*Yersinia* outer membrane proteins), proteínas que determinan la resistencia de la bacteria al sistema inmune. El gen *ysc* codifica la producción de proteínas Ysc (*Yersinia* secretion complex). *virF* es un regulador transcripcional de otros genes plasmídicos (*Yersinia* Virulence) (Bancerz-Kisiel y Szweda, 2015) (Gnanasekaran et al., 2017). Las cepas patógenas que poseen el plásmido pYV tienen propiedades comunes como requerir calcio para el crecimiento, la capacidad de absorber rojo Congo y la autoaglutinación (Zadernowska et al., 2014).

Además, las cepas patógenas poseen genes cromosómicos que codifican factores de virulencia, y que son más estables que los localizados en el plásmido pYV. Entre estos genes se incluye el gen *ail* que codifica la producción de la proteína ail (*attachment-invasion locus*), proteína de membrana externa necesaria para la adhesión y entrada a las células. El gen *inv* codifica la producción de una proteína (invasin) requerida por la bacteria para su traslocación (paso) a través de las células. El gen *myfA* (*mucoïd Yersinia fibrillae* A) codifica la producción de fimbrias para la adhesión. Los genes

*ystA*, *ystB* y *ystC* (*Yersinia heat-Stable Enterotoxin*) codifican la producción de enterotoxina termoestable de *Yersinia* A, B y C, respectivamente (Sabina et al., 2011) (Bancerc-Kisiel y Szweda, 2015).

El biotipo 1B se considera como uno de los más patógenos para el ser humano. Las cepas que pertenecen a este biotipo poseen el determinante de virulencia: isla de elevada patogenicidad (HPI) que codifica genes para la captación de hierro (Zadernowska et al., 2014).

Las cepas que pertenecen al biotipo 1A no poseen el plásmido pYV, y carecen de la mayoría de los genes de virulencia cromosómicos, aunque ocasionalmente puede tener algunos de los genes cromosómicos que codifican factores de virulencia como *ail*, *inv*, *ystA*, *ystB* *myfA* (Bonardi et al., 2010) (Sabina et al., 2011) (Zadernowska et al., 2014).

Aunque existen más de 70 serotipos O, sólo algunos de estos serotipos se consideran patógenos para el ser humano (O:3, O:5, O:8, O:9, O:13, O:21, O:27) (EFSA, 2007) (Zadernowska et al., 2014). El serotipo O:3 es el más frecuentemente aislado en personas (Montville et al., 2012). Algunos serotipos son comunes en cepas patógenas y no patógenas, por lo que el serotipo no se considera un marcador de patogenicidad fiable, y se considera necesario conocer tanto el biotipo como el serotipo de *Y. enterocolitica* (EFSA, 2007) (Bancerc-Kisiel y Szweda, 2015).

Las cepas de *Y. enterocolitica* que con mayor frecuencia causan enfermedad en el ser humano pertenecen a los siguientes biotipos y serotipos: 1B/O:8, 2/O:5,27, 2/O:9, 3/O:3, y 4/O:3, y con menor frecuencia al bioserotipo 3/O:5,27 y otros serotipos del biotipo 1B (O:7, O:13, O:21, entre otros) (EFSA, 2007) (Zadernowska et al., 2014). En Europa los biotipos y serotipos más frecuentemente asociados a infecciones por *Y. enterocolitica* en personas son 4/O:3 y 2/O:9 (EFSA, 2007), mientras que en Estados Unidos y Canadá el biotipo más frecuente es el 1B, serotipos O:4,32; O:8, O:13; O:18; O:20 y O:21. El biotipo 3 serotipo O:3 se ha aislado en Japón y China (Petsios et al., 2016). El biotipo 5 raramente se aísla (EFSA, 2007).

*Y. enterocolitica* se ha aislado a partir de muestras ambientales, alimentos como la carne (de cerdo, vacuno), leche, queso, pescado y vegetales (EFSA, 2007) (Sabina et al., 2011). La mayoría de las cepas aisladas no han sido catalogadas como patógenas (ICMSF, 1996) (EFSA, 2007). El reservorio principal de las cepas patógenas de *Y. enterocolitica* para el ser humano es el ganado porcino (Falcao et al., 2006) (Fredriksson-Ahooma et al., 2006) (Bancerc-Kisiel y Szweda, 2015).

En animales, las infecciones por *Y. enterocolitica* son generalmente asintomáticas. En concreto en porcino raramente se observan síntomas clínicos, a excepción de diarrea en animales de menos de 8 semanas (Bancerc-Kisiel y Szweda, 2015).

Los brotes de yersiniosis se asocian con frecuencia al consumo de carne de cerdo y derivados crudos o insuficientemente cocinados (Bancerc-Kisiel y Szweda, 2015). Existe una correlación entre las cepas aisladas en porcino y las cepas aisladas en casos clínicos de yersiniosis en humanos (Bancerc-Kisiel y Szweda, 2015). No obstante, hay que indicar que también puede ser transmitida por el consumo de carne de vacuno, ovino y caprino, leche contaminada y agua no tratada (Zadernowska et al., 2014). Se ha señalado la contaminación de alimentos por manipuladores; sin embargo la transmisión persona-persona raramente se produce (Sabina et al., 2011).

La yersiniosis afecta especialmente a niños, concretamente en los menores de 5 años *Y. enterocolitica* provoca síndromes gastrointestinales de distinta intensidad, desde diarrea leve a adenitis me-

sentérica simulando apendicitis. Los síntomas de esta enfermedad incluyen fiebre, dolor abdominal y diarrea, con frecuencia hemorrágica. Pocas veces la infección se complica y da lugar a problemas articulares que pueden llegar a permanecer durante meses. El periodo de incubación es de 4-7 días, después de la exposición, y los síntomas pueden durar de 1 a 3 semanas, e incluso más tiempo en raras ocasiones. En adultos los síntomas predominantes pueden ser dolor abdominal en el lado derecho del abdomen y fiebre, lo cual puede provocar que se llegue a confundir con apendicitis, estos síntomas también se pueden presentar en niños (Montville et al., 2012) (Bancerc-Kisiel y Szweda, 2015).

### 2.2.1.3 Datos epidemiológicos y de prevalencia en alimentos

En la Unión Europea (UE), la yersiniosis es la tercera zoonosis en número de casos de transmisión alimentaria más frecuente, con 6 861 casos confirmados en 2016 (EFSA, 2017). La tasa de notificación en la UE es de 1,82 casos por 100 000 habitantes. Se observa una tendencia a disminuir desde 2008 a 2016, no obstante no se observa un aumento o disminución significativa en el periodo 2012-2016. Hay que tener en cuenta que no en todos los países miembros la notificación de los casos de yersiniosis es obligatoria. Las tasas de notificación de yersiniosis son más altas en los países del noreste de Europa. Los países con mayor tasa de notificación en 2016 fueron Finlandia (7,42 casos por 100 000 habitantes) y la República Checa (5,76 casos por 100 000 habitantes). En 2016 las cifras registradas por EFSA señalan 485 casos confirmados en España (EFSA, 2017).

*Y. enterocolitica* es la especie más frecuentemente aislada en la UE (en el 99,1 % de los casos en 2016). La información sobre los serotipos involucrados de *Y. enterocolitica* en 2016 solo fue proporcionada en el 39,5 % de los casos confirmados por 14 países. Según los datos recogidos el serotipo más frecuente es el O:3 (84,6 %) seguido de O:9 (11,8 %) y O:8 (1,7 %). La información de biotipo solo fue recogida en el 4,6 % de los casos confirmados por cinco países (Austria, Dinamarca, Finlandia, Lituania y Polonia). El biotipo dominante entre los notificados en 2016 fue el biotipo 4 (79,6 %) seguido del biotipo 2 (16,9 %) y biotipo 3 (2,5 %) (EFSA, 2017).

Referente a la hospitalización en 2016 en la UE se cuenta con datos de 14 países con un total de 1 653 casos (24,1 % del total), siendo el porcentaje de hospitalización del 31,5 %. El porcentaje de hospitalización más elevado (54,8-91,7 %) se observó en Lituania, Polonia y Rumania (EFSA, 2017).

En relación con la gravedad de la infección por *Y. enterocolitica* hay que indicar que en Estados Unidos se estima que el porcentaje de hospitalizaciones es del 34,4 %, con un 2 % de mortalidad (Scallan et al., 2011).

En España, en 2015 se declararon 478 casos de yersiniosis. La mayor incidencia de yersiniosis en España se observa en menores de 15 años especialmente en menores de 5 años (CIBERESP, 2017). Según el informe anual del SIM (Sistema de Información Microbiológica) de 2015 de un total de 345 aislamientos se identificó el serogrupo O:3 en 40. No consta la presencia de otros serogrupos. En 2016 se notificaron un total de 378 aislamientos de *Y. enterocolitica* procedentes de 44 laboratorios, en 55 de ellos se identificó *Y. enterocolitica* O:3 (SIM, 2017). No se cuenta con información relacionada con los biotipos de *Y. enterocolitica*.

A pesar de que *Y. enterocolitica* se encuentra en todas las zonas climáticas, los distintos bioesrotipos se han asociado a regiones geográficas específicas. Así *Y. enterocolitica* 4/O:3 y 2/O:9 se

han aislado principalmente en Europa y *Y. enterocolitica* 1B/O:8 en Estados Unidos. *Y. enterocolitica* 4/O:3 predomina en la mayoría de los países europeos, mientras que en el Reino Unido predomina *Y. enterocolitica* 2/O:9 (EFSA, 2007). Como consecuencia del flujo de materias primas, piensos y alimentos, así como el turismo, se ha observado un aumento de casos de enfermedad originados por *Y. enterocolitica* 1B/O:8 en zonas donde no se había aislado previamente como Polonia y Alemania (Rastawicki et al., 2009) (Zadernowska et al., 2014). Este hecho es preocupante, ya que las cepas de *Y. enterocolitica* del biotipo 1B y serotipo O:8 son consideradas las más peligrosas y virulentas para el ser humano (Barcercz-Kisiel et al., 2015). Según datos de EFSA en 2016 el serotipo O:8 se aisló en el 1,7 % de los casos notificados (EFSA, 2017). Parece conveniente hacer un seguimiento sobre la presencia de *Y. enterocolitica* 1B:O:8, dada su especial virulencia.

En un estudio realizado en el Norte de España sobre infecciones en personas por *Y. enterocolitica* en el periodo 1985-2014 se observó que el 99 % de los aislados eran del serotipo O:3. En los aislados en los que se procedió a analizar el biotipo se observó que era el biotipo 4. No obstante hay que señalar que se identificaron cinco aislados 2/O:9 y un aislado 1B/O:8 (Marimon et al., 2017).

En Estados Unidos, un trabajo llevado a cabo sobre enfermedades de transmisión alimentaria por Scallan et al. (2011) estima que el 90 % de los casos de infección por *Y. enterocolitica* son de origen alimentario, aunque hay que indicar que dichos autores señalan que todos los brotes notificados en Estados Unidos se asocian a alimentos contaminados. Estudios realizados en Reino Unido y Francia estiman que el porcentaje de casos de *Y. enterocolitica* atribuidos al consumo de alimentos es del 90 % (Adak et al., 2002) (Vaillant et al., 2005).

En relación con la presencia de cepas patógenas aisladas tanto de muestras procedentes de personas como de animales, alimentos y ambiente destaca el estudio realizado por Le Guern et al. (2016) con 19 670 cepas de *Yersinia* aisladas en Francia durante más de 50 años. Estos autores observaron que la mayoría de las cepas de origen humano eran patógenas (59 %) predominando *Y. enterocolitica* bioserotipo 4/O:3 (66,8 %), seguido de *Y. enterocolitica* 2/O:9 (23,8 %). En cerdos y carne de porcino se detectó exclusivamente *Y. enterocolitica* 4/O:3. En muestras ambientales y alimentos raramente se aislaron cepas patógenas (0,2 %). La mayor fuente de cepas patógenas de *Yersinia* fueron los animales, con una destacada asociación entre *Y. enterocolitica* 4/O:3 y ganado porcino.

Se estima que entre el 86,1 y el 100 % de los brotes por *Y. enterocolitica* en personas se asocian a la carne de porcino (Painter et al., 2013). Por otro lado, existe una correlación entre las cepas aisladas en porcino y las cepas aisladas en casos clínicos de yersiniosis en humanos (Bancercz-Kisiel y Szweda, 2015).

En el informe de EFSA correspondiente al año 2016 sólo se incluyen datos de presencia de *Y. enterocolitica* en ganado de un país (Italia) con un total de 100 muestras analizadas. Respecto a la presencia en carne y productos cárnicos únicamente se incluye información de cinco países con un total de 971 muestras analizadas. La presencia en carne fue de baja (>1-10 %) a alta (>20-50 %) (EFSA, 2017).

A pesar de que en un informe de EFSA se sugirieron especificaciones técnicas para armonizar la vigilancia y notificación de *Y. enterocolitica* en porcino a nivel de matadero (EFSA, 2009), la información incluida en el último informe de EFSA indica que los datos presentados no siguen un

diseño armonizado (EFSA, 2017), variando la prevalencia de cepas patógenas de *Y. enterocolitica* en porcino según la metodología utilizada, zona de muestreo y área geográfica (Petsios et al., 2016).

*Y. enterocolitica* se encuentra con frecuencia presente en cavidad oral (especialmente en amígdalas), heces y tracto gastrointestinal de ganado porcino (EFSA, 2007) (Fredriksson-Ahomaa et al., 2009). Las amígdalas de porcino suponen una fuente de contaminación importante en matadero. Fredriksson-Ahomaa et al. (2009) detectaron *Y. enterocolitica* en el 62 % de las amígdalas analizadas, mientras que en heces se observó en el 16 %. En un estudio realizado por Bonardi et al. (2013) se detectó presencia de esta bacteria en el 10,8 % de amígdalas, 17,1 % de heces, 11,8 % del agua de escaldado y 2,4 % de canales. De las cepas aisladas fueron identificadas como patógenas el 24,4 %. Dichas cepas patógenas fueron aisladas del 8 % de amígdalas, 1,1 % de muestras fecales y 0,7 % de canales. Otros estudios indican distintas prevalencias de *Y. enterocolitica* en amígdalas muestreadas en mataderos de porcino. Así se ha observado una prevalencia del 93 % en España, 44-55,3 % en Bélgica y 32 % en Italia, siendo el bioserotipo más frecuentemente aislado 4/O:3 (Ortiz Martínez et al., 2011) (Van Damme et al., 2015). Aunque el biotipo 4 serotipo O:3 es el que más frecuentemente se aísla en porcino, hay que señalar que también se han identificado los siguientes biotipos minoritarios: 2/O:9 2/O:5, 27 y 3/O:9 (Bonardi et al., 2003, 2007, 2013) (Fredriksson-Ahomaa et al., 2007) (Ortiz Martínez et al., 2011). De hecho en Inglaterra los más frecuentemente aislados son 2/O:9 y 2/O:5 (Ortiz Martínez et al., 2010).

En relación con la presencia de genes que codifican factores de virulencia en cepas de *Y. enterocolitica* aisladas en matadero de porcino del bioserotipo 4/O:3 se han identificado *ystA* (100 %), *inv* (95,8 %), *ail* (87,5 %) y *yadA* (54,2 %). En los aislados de *Y. enterocolitica* 2/O:9 los genes *ail*, *inv* y *ystA* se han identificado en el 100 % de los aislados, mientras que el *ystB* se aisló en el 25,0 %. El gen *yadA* asociado al plásmido pYV no se ha detectado en los aislados 2/O:9 (Bonardi et al., 2013). En las cepas de *Y. enterocolitica* del biotipo 1A, consideradas como no patógenas se han identificado los siguientes genes *inv* (95,4 %), *ystB* (72,4 %), *ystA* (11,5 %) y *ail* (6,9 %) (Bonardi et al., 2013).

Algunos estudios sobre la prevalencia de *Y. enterocolitica* patógenas se basan en detección del gen *ail* para discriminar entre las cepas patógenas y no patógenas. Otros autores utilizan como criterio para la clasificación de *Y. enterocolitica* patógena la presencia tanto del gen *ail* como del gen *ystA* (Van Damme et al., 2015) (Lorencova y Slany, 2016). Sin embargo, en algunos aislados 4/O:3 el gen *ail* no se ha identificado. Por otro lado, la presencia del gen *ail* se ha considerado que no es suficiente para asegurar la patogenicidad de las cepas (Sihvonen et al., 2011). Este hecho se debe tener en cuenta al comparar los resultados de los distintos estudios.

Los estudios disponibles señalan que las amígdalas son la fuente principal de cepas patógenas de *Y. enterocolitica* para el ser humano (Bonardi et al., 2013) (Nesbakken et al., 2003, 2006). Durante el procesado de la carne de porcino en matadero *Y. enterocolitica* presente en cavidad oral o contenido intestinal puede contaminar la canal y el ambiente del matadero (Laukanen-Ninios, 2014). Se han señalado recuentos de 4,4 log ufc/g en amígdalas y 3,8 log/ufc en heces, mientras que el recuento en canal es en la mayoría de los casos inferior al límite de detección (Van Damme et al., 2015). Por ello, se ha señalado la necesidad de adoptar medidas a nivel de matadero de porcino

para minimizar la contaminación de las canales con *Y. enterocolitica* a partir de cavidad oral, heces, y contenido intestinal (Laukanen-Ninios, 2014).

Los estudios sobre la presencia de *Y. enterocolitica* en carne y productos cárnicos de cerdo señalan una prevalencia del 15,2 %, con recuentos muy bajos (Bonardi et al., 2010). Se ha encontrado una mayor prevalencia de *Y. enterocolitica* en carne picada de cerdo (20 %) que en salchichas frescas (10,9 %) (Bonardi et al., 2010). En cuanto a la prevalencia de *Y. enterocolitica* patógena en carne de porcino se cuenta con información limitada. En lengua se han encontrado las cifras más elevadas con un 40 %, seguido de corazón 18 %, en carne picada los valores señalados por distintos autores oscilan entre el 4,9 y el 17,2 % (Messelhäusser et al., 2011) (Lorencova y Slany, 2016). Algunos estudios señalan tasas de prevalencia del 11 % en embutidos fermentados de porcino (Lambertz et al., 2007). Otros autores también han señalado prevalencia de *Y. enterocolitica* patógena alta en productos de cerdo frescos (Johannessen et al., 2000). La metodología utilizada para determinar *Y. enterocolitica* patógena puede influir de forma importante en las tasas de prevalencia encontradas en la bibliografía.

En carne de porcino se observa un alto porcentaje del biotipo 1A (90,9 %), aunque también se ha identificado el biotipo 2 serotipo O:9 (Bonardi et al., 2010). La carne de porcino puede ser una fuente importante de *Y. enterocolitica* 4/O:3 (EFSA, 2007). En las cepas aisladas del biotipo 1A se han detectado los genes que codifican factores de virulencia *ail*, *inv*, *ystA* y *ystB*. Algunos autores han señalado que la mayoría de las cepas del biotipo 1A poseen el gen *ystB* (90 %) (Bonardi et al., 2010). Las cepas del biotipo 1A se consideran generalmente no patógenas, sin embargo se han aislado en casos clínicos de yersiniosis, además se ha asociado con algunos brotes de yersiniosis (Ratnam et al., 1982) (Greenwood y Hooper, 1990) (Tennant et al., 2003), por ello algunos autores indican que las cepas del biotipo 1A se pueden considerar como patógenos emergentes (Batzilla et al., 2011) (Bancerc-Kisiel y Szweda, 2015). Es necesario reconsiderar el potencial patógeno de las cepas de *Y. enterocolitica* del biotipo 1A, investigando si se limita a una pequeña proporción o se va ampliando.

#### 2.2.1.4 Metodologías para la detección

La prevalencia de *Y. enterocolitica* patógena en carne de cerdo y en canales puede estar subestimada como consecuencia de las limitaciones de los métodos de detección debidas a la baja concentración de cepas patógenas presentes en alimentos, las similitudes con otras *Enterobacteriaceae*, y la heterogeneidad de *Y. enterocolitica* ya que incluye tanto cepas patógenas como no patógenas (EFSA, 2007) (Petsios et al., 2016). En muestras tomadas a nivel de matadero en amígdalas y heces, *Y. enterocolitica* está presente en mayor concentración que en las canales por lo que su detección es más probable (Zadernowska et al., 2014).

Para la detección de *Y. enterocolitica* se han utilizado técnicas tradicionales de cultivo procediendo a la identificación posterior mediante pruebas bioquímicas, técnicas serológicas y de microscopía. En alimentos *Y. enterocolitica* está presente en bajo número y a menudo hay presente una gran variedad de microorganismos, por lo que el aislamiento directo en medios selectivos puede no ser adecuado. Los métodos de aislamiento suelen incluir una fase de enriquecimiento, siembra en medios selectivos y posterior confirmación de colonias típicas seleccionadas. Las cepas

aisladas pueden ser posteriormente caracterizadas: biotipo, serotipo, factores de virulencia (EFSA, 2007). Hay que tener en cuenta que los métodos utilizados pueden tener como resultado el aislamiento de cepas de *Y. enterocolitica* no patógenas. La utilización de procedimientos adecuados de enriquecimiento junto con medios cromogénicos puede mejorar el aislamiento de cepas patógenas de *Y. enterocolitica* (Zadernowska et al., 2014) (Petsios et al., 2016). El biotipado es esencial para la diferenciación entre cepas patógenas y no patógenas (EFSA, 2007).

Las técnicas de biología molecular permiten solucionar las limitaciones de los métodos de cultivo tradicional. La utilización de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Y. enterocolitica* en alimentos detecta mayores tasas de prevalencia que los métodos tradicionales de cultivo, aunque tiene la limitación de no diferenciar células viables de no viables (Bonardi et al., 2014) (Zadernowska et al., 2014). El desarrollo de métodos que permiten detectar únicamente células viables como PCR a tiempo real, supone un avance importante (Lambertz et al., 2008).

EFSA ha recomendado la toma de muestras de amígdalas en mataderos de porcino. Entre la metodología a utilizar se recomienda la norma ISO 10273:2003 (ISO, 2003). Asimismo, se recomienda el biotipado y serotipado de las cepas aisladas (EFSA, 2007, 2009). La metodología ISO 10273:2003 para la detección de cepas patógenas de *Y. enterocolitica* se considera que tiene limitaciones, por lo que se han propuesto metodologías alternativas (Bonardi et al., 2016). En 2017 se ha actualizado la Norma ISO 10273 para la detección de *Y. enterocolitica* patógena (ISO, 2017). Esta norma introduce cambios en relación con los medios de cultivo, tiempos de incubación, pruebas de confirmación. Para la confirmación de *Y. enterocolitica* patógena añade pruebas bioquímicas que permiten diferenciar cepas patógenas y no patógenas, así como la confirmación opcional alternativa mediante la detección del gen *ail* usando técnicas de PCR a tiempo real.

La determinación del biotipo tanto en la norma ISO 10273:2003 como en la norma ISO 10273:2017 se basa en los siguientes ensayos: fermentación de la xilosa y trehalosa, hidrólisis de la esculina y detección de pirazimidasa, lipasa, e indol (ISO, 2003, 2017).

La detección de los serotipos basados en antígenos O más frecuentes (O:3, O:5, O:8, O:9, O:5 y O:27) utiliza técnicas de aglutinación con antisueros específicos (Zadernowska et al., 2014) (Petsios et al., 2016). Para la diferenciación de cepas patógenas de *Y. enterocolitica* se han utilizado técnicas basadas en la determinación de características fenotípicas asociadas al plásmido de virulencia pYV como son la dependencia del calcio para el crecimiento, la capacidad de absorber rojo Congo y la autoaglutinación. En este sentido se ha utilizado el agar rojo Congo-oxalato de magnesio (CR-MOX) para diferenciar las cepas patógenas (Petsios et al., 2016).

El análisis serológico mediante técnicas ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) puede ser utilizado para la estimación de la prevalencia de *Y. enterocolitica* en ganado porcino y en matadero (Nielsen et al., 1996) (Bonardi et al., 2016).

La técnica de PCR se ha utilizado para la detección de genes asociados a la virulencia de *Y. enterocolitica* y para la identificación de aislados patógenos (Fredriksson-Ahomaa y Korkeala, 2003). No obstante, su eficacia es limitada, ya que en las cepas no patógenas (biotipo 1A) puede haber presencia de algunos de los genes de virulencia. La diferenciación de cepas patógenas y no patógenas se ha realizado mediante detección de los genes plasmídicos de patogenicidad o de genes

cromosómicos (Bonardi et al., 2010, 2013). Hay que tener en cuenta que la pérdida del plásmido de virulencia pYV es frecuente en *Y. enterocolitica*, mientras que la pérdida de los genes cromosómicos de virulencia es infrecuente (Zheng et al., 2008). En el caso de que se opte por el plásmido de virulencia pYV los ensayos deben realizarse en una fase temprana de la confirmación. Los genes *yadA*, *virF* localizados en el plásmido pYV se han utilizado para discriminar entre cepas patógenas y no patógenas (Bonardi et al., 2014). El gen *ail* localizado en el cromosoma de cepas patógenas de *Y. enterocolitica* es el más frecuentemente utilizado para discriminar entre las cepas patógenas y no patógenas (Petsios et al., 2016). Algunos autores han aislado este gen en todos los aislados de *Y. enterocolitica* 4/0:3. Sin embargo, en algunos aislados patógenos 4/0:3 el gen *ail* no se ha identificado. Por otro lado, la presencia del gen *ail* se ha considerado que no es suficiente para asegurar la patogenicidad de las cepas, estando presente también en algunas cepas del biotipo 1A (Sihvonen et al., 2011). Otros genes cromosómicos presentes en cepas patógenas de *Y. enterocolitica* detectados mediante técnicas de PCR incluyen gen *inv*, gen *ystA*. (Van Damme et al., 2015) (Lorencova y Slany, 2016).

### 2.2.1.5 Pasos futuros

Dado que el ganado porcino es el principal reservorio de *Y. enterocolitica* patógena parece importante contar con información sobre la prevalencia de este patógeno a nivel de matadero, incluyendo información sobre los biotipos y serotipos presentes.

En carne de porcino las cepas de *Y. enterocolitica* aisladas son mayoritariamente del biotipo 1A. Los biotipos patógenos son aislados ocasionalmente en carne de cerdo. No obstante, es importante contar con más información sobre la prevalencia de *Y. enterocolitica* patógena en carne de porcino, incluyendo información sobre los biotipos y serotipos. Dadas las limitaciones de las metodologías utilizadas y los bajos recuentos en carne de porcino, la prevalencia puede estar subestimada. Dada la mayor prevalencia en carne picada de porcino observada en la bibliografía y su asociación a casos de yersiniosis, se considera que sería un buen objetivo para hacer un plan de control, siendo aconsejable proceder a determinar tanto el biotipo como el serotipo.

Es importante armonizar la metodología para poder comparar los resultados obtenidos. Principal atención se debe prestar a las limitaciones de las distintas metodologías utilizadas. La Norma ISO 10273:2017 incluye la detección de *Y. enterocolitica* patógena, y añade pruebas relacionadas con la patogenicidad que permiten diferenciar las cepas patógenas y no patógenas. Esta norma incluye la confirmación opcional alternativa mediante la detección del gen *ail* mediante técnicas de PCR a tiempo real, aunque es preciso considerar que este gen presenta ciertas limitaciones ya que no se ha identificado en algunos aislados patógenos 4/0:3. Además, la presencia del gen *ail* se ha considerado que no es suficiente para asegurar la patogenicidad de las cepas, estando presente también en algunas cepas del biotipo 1A.

Con el fin de minimizar la contaminación de las canales de porcino en matadero hay que prestar especial atención a las medidas higiénicas adoptadas.

El tratamiento térmico juega un papel importante en el control de *Y. enterocolitica* por ello se pueden hacer campañas dirigidas al consumidor para que cocine adecuadamente la carne.

## 2.2.2 *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en productos de la pesca y moluscos bivalvos

### 2.2.2.1 Información general

Las bacterias del género *Vibrio* son bacilos Gram negativos, relacionados fundamentalmente con hábitats acuáticos. Hay más de 100 especies dentro de este género, de las que poco más de 10 se han asociado con enfermedades humanas (Janda et al., 2015). Las especies relevantes para la salud humana, aparte de *V. cholerae* (*V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*) se asocian principalmente con aguas templadas (> 15 °C) y baja salinidad (< 25 ‰ NaCl), condiciones que se pueden anticipar como posibles en muchas zonas de Europa como consecuencia del calentamiento global (Baker-Austin et al., 2013) (Roux et al., 2015).

### 2.2.2.2 Características generales

*V. parahaemolyticus* es causante de gastroenteritis aguda caracterizada por diarrea, náuseas, vómitos, dolor abdominal, dolor de cabeza, fiebre y escalofríos, a través del consumo de pescado y moluscos crudos (Nelapati et al., 2012). Si bien en la mayor parte de las ocasiones se trata de una diarrea acuosa autolimitante, ocasionalmente causa diarrea sanguinolenta y, raramente, arritmia cardíaca (Honda et al., 1976). Es la principal causa de gastroenteritis bacteriana por consumo de productos de la pesca en todo el mundo (Rippey, 1994). También causa diarrea del viajero, infecciones de heridas, otitis y septicemia secundaria (Pavia et al., 1989).

La cantidad mínima necesaria para que se desarrolle la gastroenteritis es de entre  $2 \times 10^5$  y  $3 \times 10^7$  bacterias, siendo el periodo de incubación de 3 a 24 horas, generalmente entre 10 y 15 horas (Nelapati et al., 2012).

Hasta la fecha, se han identificado 13 serotipos O y alrededor de 70 serotipos K en *V. parahaemolyticus*, en base al antígeno somático (O) y capsular (K) (Jones et al., 2012), siendo el serotipo O3:K6 el responsable de la mayoría de los brotes en todo el mundo desde 1996 (Hara-Kudo et al., 2012).

Su patogenicidad está íntimamente relacionada con la síntesis de una hemolisina termoestable directa (*thermostable direct hemolysin*; TDH) conocida como hemolisina Kanagawa (Honda e lida, 1993). Otros serotipos producen una hemolisina relacionada con TDH (*thermostable related hemolysin*; TRH) que también se relaciona con la patogenicidad (Honda et al., 1988). TDH y TRH, codificadas respectivamente por los genes *tdh* y *trh*, son factores de virulencia importantes de este microorganismo, con propiedades citotóxicas, cardiotóxicas y enterotóxicas (Honda e lida, 1993). El serotipo O3:K6, uno de los más prevalentes en infecciones gastrointestinales, por ejemplo, es portador del gen *tdh* (Matsumoto et al., 2000).

*V. vulnificus* es una especie que se asocia con casos de enfermedad en animales y humanos. Se han descrito tres biotipos distintos, de los cuáles el biotipo 1 es el que se relaciona con los casos humanos graves, mientras que el biotipo 2 se asocia al cultivo de anguilas y el 3, muy infrecuente, se considera un híbrido de los dos anteriores y hasta el momento solo se ha detectado en Israel (FAO/OMS, 2005) (Horseman y Surani, 2011). En humanos puede producir enfermedad gastrointestinal, aunque la manifestación más común es la infección de heridas (por exposición a aguas contaminadas) o sepsis primaria debido a la ingestión de moluscos, principalmente ostras contaminadas (SCVMPH, 2001) (Janda et al., 2015). Los síntomas de la infección aparecen con rapidez y pueden

ser fatales, sobre todo en pacientes varones inmunocomprometidos o que presentan problemas de salud que resulten en niveles elevados de hierro sérico (hemocromatosis), como enfermedades hepáticas, diabetes o alcoholismo. La tasa de mortalidad oscila entre el 50 y el 60 % de los pacientes con septicemia.

Existen diversos estudios encaminados a dilucidar los mecanismos empleados por *V. vulnificus* para producir enfermedades tan graves. Hay numerosos factores involucrados, como la producción de lisina descarboxilasa, que permite neutralizar la acidez estomacal, la presencia de la cápsula polisacáridica, para evitar la fagocitosis, o la producción de sideróforos y de una toxina hemolítica, implicados en la captación de hierro (Horseman y Surani, 2011). Estos factores, entre otros, contribuyen al desarrollo de la infección; sin embargo, el desenlace fatal de la infección parece ser debido al lipopolisacárido (LPS), ya que cuando se inyecta en animales de experimentación provoca una muerte rápida, efecto que no se observa cuando se inyecta LPS neutralizado. Además, también aporta una explicación al hecho de que la infección por *V. vulnificus* afecte casi exclusivamente a varones, ya que se ha observado una inhibición de la acción del LPS mediada por estrógenos (Oliver, 2013).

### 2.2.2.3 Datos epidemiológicos y de prevalencia en alimentos

Tanto *V. parahaemolyticus* como *V. vulnificus* están ampliamente diseminados por el medio costero, siendo importantes las condiciones ambientales del agua, principalmente la salinidad (son microorganismos halófilos, que crecen entre 2 y 25 ‰ NaCl, con un óptimo entre 10 y 18 ‰ NaCl) y la temperatura (es especialmente preocupante a temperaturas superiores a 20 °C, aunque por encima de 30 °C se ven afectados negativamente; una temperatura de 13 °C se considera el límite inferior de crecimiento, pero por debajo de esta temperatura pueden encontrarse en un estado viable no cultivable) (Kaneko y Colwell, 1975) (Oliver, 2015). Los vibrios son las bacterias predominantes en el tracto digestivo de ostras, almejas, mejillones y langostinos, siendo el consumo de moluscos crudos y de crustáceos y pescados crudos o insuficientemente cocinados las fuentes más importantes de la enfermedad (Nelapati et al., 2012).

La incidencia de *V. parahaemolyticus* tiene un marcado carácter estacional, restringiéndose a los meses de verano, debido a la sensibilidad de este microorganismo a las bajas temperaturas (Kaneko y Colwell, 1975). En zonas tropicales, cabe esperar que su incidencia se extienda durante todo el año (Elhadi et al., 2004).

*V. parahaemolyticus* se aisló por primera vez tras un brote asociado al consumo de sardinas (272 casos y 20 muertes) en Japón en 1950 (Fujino et al., 1953). Su incidencia ha ido en aumento en muchas partes del mundo (Hara-Kudo et al., 2012). Su diseminación por todo el mundo se ha visto facilitada por distintas vías. Factores como el cambio climático, que ha originado nuevas corrientes oceánicas y un calentamiento de las aguas costeras (Vezzulli et al., 2013) (Burge et al., 2014), el transporte y almacenamiento inadecuado de pescados y productos de la pesca a través de largas distancias, o las propias aguas marinas que utilizan los barcos como lastre, han facilitado su expansión (Martínez-Urtaza et al., 2016, 2018). Una vez introducido en una nueva región, se vuelve endémico. En una simulación desarrollada recientemente bajo diferentes escenarios de clima futu-

ro y horizontes de tiempo, y considerando el efecto de los factores que contribuyen al crecimiento de *V. parahaemolyticus* desde las aguas marinas hasta el consumo, se observa que conforme las aguas costeras se calienten, el riesgo de brotes de este microorganismo continuará aumentando (Ortiz-Jiménez, 2018). A estos hechos hay que añadir el incremento en la resistencia a antibióticos, observado también en *V. parahaemolyticus*, habiéndose encontrado que un 90 % de las cepas aisladas en un estudio reciente eran resistentes a la estreptomycin, y también a otros antibióticos (Xie et al., 2017).

En Europa, los principales brotes relacionados con *Vibrio* se han producido en el área del Mar Báltico durante los meses de verano, por el uso recreativo del agua del mar (Baker-Austin et al., 2010). También en Italia y en Francia se produjeron casos clínicos por el serotipo O3:K6 de *V. parahaemolyticus*, relacionados con consumo de moluscos (Baker-Austin et al., 2010). En su informe anual de 2015 sobre brotes de enfermedades de transmisión alimentaria, EFSA recogió cuatro brotes debidos a *V. parahaemolyticus* en Francia, con 29 casos. Los alimentos responsables de dos de esos brotes fueron crustáceos, mariscos, moluscos y productos derivados (EFSA, 2016). Estos datos fueron similares a los reportados en 2014. En 2016 se reportaron ocho brotes, con 76 casos en total (EFSA, 2017). Sin embargo, este último informe no diferencia entre las especies de *Vibrio*.

En España, y más concretamente en Galicia, se han producido tres brotes importantes en los último 20 años, uno en 1999, con 64 casos por consumo de ostras crudas, otro en 2004, con 80 casos relacionados con el serotipo O3:K6 y otro, con cerca de 100 casos, por consumo de gambas en 2012 (Martínez-Urtaza et al., 2016). Sin embargo, desde 2012, se ha observado una clara transición en la epidemiología de este patógeno, observándose casos esporádicos aislados a lo largo de la costa en lugar de grandes brotes, causados por cepas distintas y no relacionadas, asociados típicamente al consumo de productos de la pesca locales, que serían indicativos de episodios frecuentes de introducción de fuentes remotas y separadas, asociados siempre al aumento de la temperatura de las aguas costeras (Martínez-Urtaza et al., 2018). En cualquier caso, en 2015 no se notificó ningún caso de infección por *V. parahaemolyticus* al Sistema de Información Microbiológica (SIM, 2016).

Cabe destacar el caso de Japón, en el que *V. parahaemolyticus* ocasiona el 70 % de los casos de gastroenteritis asociados a los productos de la pesca (Kaneko y Colwell, 1975). No obstante, en el periodo comprendido entre 1999 y 2009 se ha observado un acusado descenso de las infecciones por este microorganismo (Hara-Kudo et al., 2012). Este descenso no se correlaciona con cambios en la contaminación de los productos de la pesca con *V. parahaemolyticus*, que sigue manteniéndose aproximadamente en los mismos niveles (Hara-Kudo et al., 2012). Sin embargo, el establecimiento de medidas higiénicas para los productos de la pesca durante la producción y comercialización (distribución y almacenamiento a temperaturas inferiores a 10 °C, empleo de aguas marinas higienizadas o de agua potable y establecimiento de límites microbiológicos de ausencia en 25 g en productos cocidos listos para el consumo y <100 NMP/g en productos crudos a lo largo de la distribución), así como la recomendación a los consumidores de consumir los productos de la pesca antes de 2 horas de haberlos sacado de la nevera, parecen ser los responsables de este descenso (Hara-Kudo et al., 2012). Otras medidas preventivas que podrían ayudar a reducir el riesgo de brotes por este microorganismo incluyen un cocinado adecuado de los productos de la pesca

previo a su consumo, así como la aplicación de medidas higiénicas adecuadas para evitar la contaminación cruzada entre alimentos crudos y cocinados (Nelapati et al., 2012).

*V. vulnificus* se ha aislado de agua, sedimentos marinos y diversos animales acuáticos, principalmente ostras y otros moluscos (Jones y Oliver, 2009). Asimismo, el área geográfica de distribución se está expandiendo como consecuencia del cambio climático y se ha detectado *V. vulnificus* en regiones hasta ahora no afectadas, como el Mar Báltico (Baker-Austin et al., 2013). En España la presencia de *V. vulnificus* ya se reseñó en los años 90, como patógeno de anguilas y su detección en las costas mediterráneas (Biosca et al., 1991). Los primeros estudios sobre su presencia en agua y moluscos bivalvos indicaban una baja prevalencia (Arias et al., 1999), investigaciones posteriores revelaron su presencia habitual en aguas y moluscos en las costas mediterráneas (Cañigral et al., 2010) y algún caso de infección de heridas como consecuencia de la exposición al agua en el Mediterráneo (Torres et al., 2002), pero también en el Cantábrico (Martínez-Rienda et al., 2007).

La enfermedad de transmisión alimentaria se da de forma casi invariable en personas con los problemas de salud ya comentados, principalmente enfermedades hepáticas, y se asocia con el consumo de ostras crudas y otros mariscos (Strom y Paranjpye, 2000) (Jones y Oliver, 2009) (Janda et al., 2015). Sin embargo, la exposición a *V. vulnificus*, incluso en personas predispuestas, no supone el desarrollo de la enfermedad, ya que se ha demostrado la existencia de dos tipos de *V. vulnificus*, denominados "C" (clínicos) y "E" (medioambientales), que se pueden diferenciar en base a sus características genéticas, y las cepas pertenecientes al tipo C serían las que provocarían la infección humana (Oliver, 2013).

*V. vulnificus* afecta fundamentalmente a varones con predisposición fisiológica, razón por la que no se asocia con brotes de enfermedad, sino que se refieren casos aislados. En Estados Unidos se registran de forma voluntaria las infecciones por *V. vulnificus* en el sistema COVIS (*Cholera and Other Vibrio Illness Surveillance*; <https://www.cdc.gov/vibrio/surveillance.html>). Los datos registrados en los últimos años indican unos valores medios de 126 casos/año y 30 fallecimientos/año, aunque se estima que el número real de casos asociados al consumo de ostras podría ser hasta 2,5 veces superior (FAO/OMS, 2005). En España la infección por *V. vulnificus* no es una enfermedad de declaración obligatoria y los datos existentes en la bibliografía registran un total de seis casos declarados, de los que cuatro fueron causados por infección de heridas tras exposición a agua de mar y dos se pueden atribuir a la ingesta de ostras crudas y mejillones al vapor (Martínez-Rienda et al., 2007). En otros países europeos la incidencia de casos de infección por *V. vulnificus* también es baja, apareciendo de forma esporádica (Baker-Austin et al., 2010). La mayor parte de los casos de infección se registran en los meses más cálidos, que coincide también con mayores tasas de aislamiento de la bacteria a partir de muestras ambientales y con una correlación altamente significativa con la temperatura del agua (Baker-Austin et al., 2010) (Oliver, 2015).

En una estimación realizada en base a los datos recogidos en Estados Unidos en la costa del Golfo de México se concluyó que la concentración de *V. vulnificus* en ostras en el momento del consumo podía llegar a ser de más de 4 log ufc/g (FAO/OMS, 2005). Aunque la mayor parte de los aislados obtenidos de ostras pertenezcan a cepas del tipo E, la ingesta de una sola ostra contaminada por

cepas del tipo C por parte de una persona predispuesta puede ser suficiente para desarrollar la infección (Oliver, 2013).

En la UE no hay un requisito legal de vigilancia de la presencia de *Vibrios* en los moluscos bivalvos, al no estar contemplado en los criterios microbiológicos vigentes para alimentos (UE, 2005). Esta circunstancia, unida a la baja incidencia de la enfermedad y a la ausencia, hasta hace poco tiempo, de técnicas de referencia para su detección, hace que muchos países no lleven a cabo una monitorización regular de esta bacteria (Baker-Austin et al., 2010). No obstante, en el caso de *V. parahaemolyticus*, la Xunta de Galicia ha sido pionera en la declaración obligatoria de sus infecciones desde 1995 (Marínez-Urtaza et al., 2016), y desde 2013 es de notificación urgente (DOG, 2013). Con todo, su incidencia es, probablemente, infravalorada.

Además, es importante tener presente que la presencia de *V. parahaemolyticus* y de *V. vulnificus* en aguas no está asociada a los indicadores de contaminación fecal (microorganismos coliformes, *E. coli*), por lo que la ausencia de estos indicadores en aguas no es una medida efectiva para garantizar la ausencia de contaminación por *Vibrio* en los moluscos, resultando más útiles otros parámetros, como la vigilancia de la temperatura y salinidad de las aguas (FAO/OMS 2005). En este sentido la red Europea de vigilancia medioambiental y epidemiológica (<https://e3geoportal.ecdc.europa.eu>) ha elaborado una herramienta (*Vibrio Map Viewer*; [https://e3geoportal.ecdc.europa.eu/SitePages/Vibrio %20Map %20Viewer.aspx](https://e3geoportal.ecdc.europa.eu/SitePages/Vibrio%20Map%20Viewer.aspx)) que monitoriza temperatura y salinidad de las aguas para establecer un modelo de probabilidad de riesgo de *Vibrio* spp.

#### 2.2.2.4 Metodologías para la detección

Se han diseñado métodos de PCR que permiten detectar los genes *tdh* y *trh* en productos de la pesca contaminados con cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* (Nordstrom et al., 2007) (Nemoto et al., 2009). Estos métodos son muy sensibles y específicos, sin embargo, no son capaces de diferenciar si el ADN procede de células vivas o muertas, lo que puede generar falsos positivos (Sakata et al., 2018).

Dado que tanto TDH como TRH son exotoxinas, cuando un alimento que contiene cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* se siembra en un caldo de cultivo, son liberadas al medio. Así pues, su presencia en medios de cultivo sirve como marcador específico de la presencia de las cepas viables patógenas de este microorganismo (Honda e Iida, 1993). Esto ha permitido desarrollar métodos inmunológicos, tales como ELISA. No obstante, este tipo de métodos son relativamente lentos y complicados de realizar.

También se han diseñado métodos inmunocromatográficos, más rápidos y sencillos, que permiten detectar individual y simultáneamente TDH y TRH (Kawatsu et al., 2006) (Sakata et al., 2018). Estos métodos permiten la detección de los productos de la pesca contaminados con cepas enteropatógenas de *V. parahaemolyticus* en un tiempo de 8,5 horas, incluyendo el tiempo de crecimiento en el medio de cultivo.

Recientemente se ha actualizado la norma ISO 21872, incluyendo las técnicas para la detección de especies potencialmente patógenas de *Vibrio* spp. y, entre ellas, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Este método consiste en un doble enriquecimiento previo de la muestra en agua de peptona

salina alcalina, cribado opcional de las muestras mediante PCR, siembra en el medio sólido (agar de tiosulfato, citrato, bilis y sacarosa; TCBS) y un segundo medio de aislamiento a elección del laboratorio, y confirmación por pruebas bioquímicas y/o mediante la detección de los genes de la hemolisina termoestable directa, *tdh*, y hemolisina relacionada con TDH, *trh* (*V. parahaemolyticus*) y hemolisina *vvha* (*V. vulnificus*) (Hill et al., 1991) (Campbell y Wright, 2003) (UNE-EN ISO, 2018).

### 2.2.2.5 Pasos futuros

La presencia de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en las aguas costeras españolas, tanto mediterráneas como cantábricas, y su implicación en infecciones humanas ya ha sido constatada y es previsible un aumento de su incidencia como consecuencia de los fenómenos asociados al calentamiento global (Baker-Austin et al., 2010). El Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) también considera que el cambio climático puede tener repercusiones en la proliferación de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* y el desarrollo de infecciones por el uso recreativo de las aguas (<https://ecdc.europa.eu/en/climate-change/climate-change-europe/water-borne-diseases>), aunque de momento, de acuerdo con los programas de trabajo del laboratorio de referencia europeo (<https://eurlcefahis.org/>), no hay una monitorización rutinaria de *V. vulnificus* en moluscos bivalvos.

Existe una técnica analítica normalizada disponible para monitorizar la presencia de *V. vulnificus* en aguas costeras y en moluscos bivalvos, aunque es necesario tener presente que la mera presencia de *V. vulnificus* no indica que se trate de cepas del tipo clínico, por lo que parece necesario profundizar en las metodologías disponibles para diferenciar entre los tipos ambientales y clínicos. En este sentido, hay descritas técnicas basadas en la detección de las variantes del gen relacionado con la virulencia (*virulence-correlated gene*) *vcgC* y *vcgE* relacionadas con los tipos clínicos y ambientales respectivamente (Warner y Oliver, 2008) y que ha sido utilizado con éxito para diferenciar entre los dos tipos de cepas en muestras de ostras portadoras de cepas de *V. vulnificus* que presentaban una gran diversidad genética (Guerrero et al., 2015).

## 2.2.3 Tipos patógenos de *E. coli* no STEC de transmisión alimentaria

### 2.2.3.1 Introducción

Aunque *Escherichia coli* es un microorganismo habitual en el tracto gastrointestinal de los humanos, hay algunos tipos que han adquirido atributos de virulencia y son capaces de producir enfermedades no solo de tipo entérico, sino también extraintestinales (ExPEC), principalmente infecciones del tracto urogenital (Kaper et al., 2004). Actualmente se reconocen seis categorías de *E. coli* diarreagénicos: enterotoxigénicos (ETEC), enteropatógenicos (EPEC), enteroinvasivos (EIEC), enteroagregativos (EAEC), de adherencia difusa (DAEC) y productores de toxina Shiga (STEC), que incluye el tipo enterohemorrágicos (EHEC) (Nataro y Kaper, 1998) (Kaper et al., 2004) (Tozzoli y Scheutz, 2014):

- STEC se caracterizan por la producción de toxinas Shiga (Stx); también se conocen como VTEC (verotoxigénicos, producen citotoxinas Vtx, que afectan a células de la línea Vero). Las cepas EHEC, además de producir estas toxinas, son portadoras del gen *eae* que produce una intimina implicada en las lesiones de “attaching and effacing” en las células infectadas.

- Las cepas EPEC presentan el gen *eae*, pero no producen toxinas Stx. Se dividen en dos grupos, cepas típicas y atípicas, basándose en la presencia de un plásmido de adherencia, que incluye los genes de "pili" implicados en la unión a células intestinales. Las cepas típicas son portadoras del plásmido y son de origen humano, mientras que las cepas atípicas, carentes del plásmido, se han aislado también de animales de abasto (Hernandes et al., 2009).
- La categoría ETEC engloba a cepas productoras de toxinas termolábiles (LT) y termoestables (ST) y se asocian con la diarrea del viajero. Aunque coloniza el intestino de animales y de humanos, hay diferencias entre los factores de virulencia que producen, indicando una cierta especificidad de huésped.
- EAEC se caracteriza por la producción de fimbrias de adherencia que dan lugar a una agregación ordenada de bacterias en la superficie de las células. También producen una toxina enteroagregativa codificada en un plásmido.
- Las cepas enteroinvasivas (EIEC) portan un plásmido de virulencia que codifica unos antígenos de invasión. Presentan muchas similitudes con *Shigella* spp. No se le conoce un reservorio animal, por lo que se supone que la transmisión es a partir de humanos infectados.
- Finalmente, DAEC es un grupo heterogéneo de cepas que se adhieren a células de la línea HEp-2 siguiendo un patrón difuso.

De todos estos grupos, son especialmente relevantes para la salud algunas cepas del tipo STEC y un patotipo particular de EAEC (del serotipo O104:H4), implicado en el brote del año 2011 (EFSA 2013, 2015). También es importante tener presente que cepas de un determinado serogrupo o serotipo pueden pertenecer a más de un patotipo, por ejemplo, los serogrupos O5 y O26 comprenden cepas EPEC y STEC y las cepas de O104:H4 causantes del brote del año 2011 tenían características de EAEC y STEC (EFSA, 2013, 2015) (Álvarez-Suárez et al., 2016).

El hospedador principal de las cepas diarreagénicas son los humanos, aunque algunos clones de EHEC, EPEC y ETEC pueden estar presentes en animales y causar enfermedad en ellos (Kaper et al., 2004).

### 2.2.3.2 Identificación del peligro

No es fácil encontrar datos sobre brotes y casos de enfermedad humana causada por *E. coli*. Muchas veces la enfermedad se resuelve de forma espontánea y no presenta gravedad, por lo que no se llegan a realizar análisis microbiológicos de muestras clínicas ni de alimentos (Nataro y Kaper, 1998). La identificación de los distintos tipos patógenos se basa en la presencia de determinados factores de virulencia, por lo que el proceso de caracterización implica normalmente el aislamiento e identificación de *E. coli* y el posterior análisis de los factores de virulencia característicos (Feng et al., 2017). Desde la aparición de STEC, concretamente del serotipo O157:H7, se han desarrollado métodos de cultivo específicos y se ha mejorado la detección en muestras clínicas y de alimentos; además la gravedad de los síndromes causados por EHEC, hace que se requiera atención médica y por tanto aumente el aislamiento e identificación de cepas de este tipo, permitiendo ampliar los estudios epidemiológicos.

Otros tipos patógenos de *E. coli* no se reportan, pasan desapercibidos o se agrupan en los informes como otros agentes etiológicos. Así, por ejemplo, en el informe anual de la UE aparecen como "Otros agentes bacterianos" (EFSA, 2017) y los datos disponibles en la página web de EFSA muestran en el listado de agentes causales de brotes "*Escherichia coli*" y "*Escherichia coli* pathogenic" sin especificar a qué se refiere cada uno de ellos (<http://www.efsa.europa.eu/en/data/biological-hazards-data>), un informe elaborado en Inglaterra y Gales diferencia VTEC O157, VTEC no-O157 y "otros *E. coli*" (Adak et al., 2002), en Estados Unidos diferencian entre "*E. coli*, ETEC", "*E. coli*, O157 STEC", "*E. coli*, non-O157 STEC" y "*E. coli*, other" (Painter et al., 2013). Finalmente en el informe que aparece en el Boletín Epidemiológico Nacional sobre los brotes de enfermedades de transmisión alimentaria entre 2008 y 2011 diferencia entre "*E. coli* verotoxigénico O157" y "*E. coli* patogénico" (Espinosa et al., 2014).

El informe de los datos de brotes de enfermedad en España entre los años 2008-2011 contempla 13 brotes por *E. coli* patogénico, con un total de 413 casos, pero no diferencia entre tipos de *E. coli* ni los atribuye a ningún alimento determinado (Espinosa et al., 2014). Los datos que aparecen en el informe de brotes de la UE en 2016, indican tres brotes por patotipos de *E. coli*, uno por EIEC en Reino Unido, uno por EPEC en Eslovaquia y otro por ETEC en Polonia; de ellos, el brote por EIEC fue el más numeroso y parece que está relacionado con un clon emergente que ha causado varios brotes y casos esporádicos en Europa (incluida España) y pertenece al serotipo O96:H19 (Michelacci et al., 2016) (EFSA, 2017). Uno de los brotes mejor estudiados atribuido a EIEC ocurrió en Italia en 2012, afectando a más de 50 empleados de la brigada contraincendios de Milán y, mediante un estudio retrospectivo de casos y controles, se relacionó con el consumo de vegetales cocidos (hojas de remolacha, judías verdes), aunque también se contemplaba la posibilidad de transmisión persona-persona o a través de ambientes contaminados (servicios), identificando como fuente probable de contaminación a un manipulador asintomático, portador de EIEC del mismo serotipo (O96:H19) que el identificado en algunos pacientes (Escher et al., 2014).

Las cepas atípicas de *E. coli* enteropatogénico (aEPEC) parecen ser un importante agente etiológico de diarrea adquirida en la comunidad en la UE, como demuestra un reciente estudio multicentro que analizó muestras procedentes de 10 países de la UE, y en el que EPEC fue el microorganismo más detectado (Spina et al., 2015). En España también se obtuvieron datos similares en un estudio realizado en Lugo sobre más de 2 000 muestras de pacientes que presentaban diarrea u otros trastornos gastrointestinales, se detectó la presencia de aEPEC en el 5,2 % de las muestras, siendo la segunda bacteria patógena tras *Salmonella* (Blanco et al., 2006), al igual que en Noruega, donde se realizó un estudio similar, en este caso sobre niños menores de 2 años, detectando aEPEC en el 10 % de las muestras, lo que indica una elevada prevalencia de este patotipo (Afset et al., 2003). Aunque se han reportado varios brotes de enfermedad producidos por EPEC, no se han podido confirmar los alimentos implicados en los mismos; en este sentido es importante tener presente que la transmisión puede ocurrir a partir de portadores humanos, pero hay numerosos trabajos que reseñan el aislamiento de cepas aEPEC, pertenecientes a serotipos implicados en enfermedad en humanos, de animales de abasto, lo que sugiere que estos animales pueden actuar como reservorio de cepas patógenas que pueden transmitirse a los humanos (Trabulsi et al., 2002) (Hernandes et al., 2009).

*E. coli* enterotoxigénico (ETEC) es otro patotipo implicado en la producción de enfermedades gastrointestinales, principalmente, diarrea acuosa relacionada con viajes al extranjero, aunque no únicamente causa esta enfermedad (Nataro y Kaper, 1998) (Kaper et al., 2004). Algunos estudios realizados en Europa indican una prevalencia importante en pacientes con diarrea, sobre todo en co-infecciones con otros tipos patógenos de *E. coli* con otros agentes, como NoV (Ethelberg et al., 2010) (Spina et al., 2015). Se han reportado varios brotes de enfermedad atribuibles a ETEC, algunos afectando a centenares de personas, y, aunque no se pudo confirmar el alimento implicado, los productos vegetales, como cebolletas, albahaca y lechuga, eran los más citados como alimentos consumidos por los afectados (Pakalniskiene et al., 2009) (Ethelberg et al., 2010) (MacDonald et al., 2015).

EAEC es otro patotipo de *E. coli* de creciente importancia, sobre todo a raíz del brote que comenzó en Alemania en el año 2011, asociado con brotes de fenogreco; este brote fue causado por una cepa de EAEC, pero que también era portadora de un profago que codificaba la toxina Stx2 (EFSA, 2015). Aunque se consideraba un agente causante de diarrea persistente en niños, actualmente se reconoce su importancia en el desarrollo de diarreas agudas en adultos (Okeke y Nataro, 2001). Se han descrito varios brotes de enfermedad gastrointestinal causada por EAEC en Europa (además del brote ya mencionado del año 2011), pero la asociación con los alimentos no se ha podido confirmar; se considera que los productos vegetales son importantes vehículos, bien contaminados en origen o por manipuladores, y también se ha descrito un brote en Italia en el que se sospechaba de queso de oveja elaborado con leche cruda como posible fuente del microorganismo (Scavia et al., 2009) (Dallman et al., 2014) (EFSA, 2015). Al igual que ocurre con ETEC, es un patotipo que aparece frecuentemente relacionado con co-infecciones con otros agentes (Spina et al., 2015).

### 2.2.3.3 Detección y vigilancia

En la UE no está establecida la vigilancia de patotipos de *E. coli* en alimentos, con la excepción de *E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC) perteneciente a los serotipos O157, O26, O111, O103, O145 y O104:H4 y únicamente en brotes (UE, 2005). Asimismo, hay una escasez de datos sobre microorganismos presentes en casos de enfermedad diarreica, ya que la mayor parte de las infecciones se resuelven de forma espontánea, sin requerir asistencia médica e incluso aunque se requiera esta asistencia, los microorganismos causantes no siempre son detectados, por falta de protocolos estandarizados para su análisis (Nataro y Kaper, 1998) (EFSA, 2015) (Spina et al., 2015).

La identificación fenotípica es difícil de abordar, ya que hay pocas pruebas bioquímicas específicas que permitan la diferenciación de patotipos, la más característica es la ausencia de movilidad y la incapacidad de fermentar lactosa de EIEC, los serotipos, con algunas excepciones, no están totalmente relacionados con tipos virulentos específicos y los ensayos empleando líneas celulares son complejos de realizar y no están al alcance de todos los laboratorios (Nataro y Kaper, 1998).

En la bibliografía se pueden encontrar diversos protocolos para la detección de los patotipos de *E. coli*, basados principalmente en la detección molecular de genes característicos de los mismos empleando sistemas de amplificación múltiple o "arrays" (Bekal et al., 2003) (Anjum et al., 2007) (Spina et al., 2015). El Laboratorio Europeo de Referencia para VTEC (<http://old.iss.it/vtec/>) también

dispone de protocolos para la detección de algunos patotipos en muestras de alimentos, basados en la amplificación mediante “Real Time-PCR” de genes característicos de los mismos, previo enriquecimiento de las muestras en agua de peptona tamponada. La detección de EAEC se basa en la amplificación de los genes *aggR* (regulador transcripcional localizado en un plásmido) y *aaiC*, de localización cromosómica y que forma parte de un sistema de secreción de tipo VI; EIEC se detecta por la amplificación del gen plasmídico *ipaH* y ETEC mediante la amplificación de los genes que codifican las toxinas LT y ST (<http://old.iss.it/vtec/>). Aunque el Laboratorio Europeo de Referencia no ofrece ningún protocolo específico para la detección de EPEC, las cepas que sean portadoras del gen *eae* y no amplifiquen los genes de las toxinas Stx entrarían dentro de la definición de este patotipo, por lo que se podría utilizar el protocolo disponible para STEC.

Teniendo en cuenta que varios de estos patotipos son de origen humano y por tanto transmisibles vía feco-oral, sería posible su presencia en prácticamente cualquier tipo de alimento susceptible de contaminación fecal o por manipulación incorrecta; sin embargo un gran número de casos de enfermedad se han visto relacionados con productos vegetales, sobre todo los denominados “vegetales de hoja” (*leafy vegetables*), que incluyen lechugas, espinacas, rúcula y, en general, diversos vegetales mezclados, y cuya implicación en la transmisión de agentes patógenos se ha incrementado considerablemente en los últimos años en los países de nuestro entorno (Callejón et al., 2015) (Yang et al., 2017), por lo que se podría considerar que la categoría de frutas y hortalizas troceadas listas para el consumo sería la más adecuada para elaborar un plan de vigilancia de patotipos de *E. coli* en alimentos. Algunos estudios realizados sobre muestras de ensaladas listas para el consumo revelan la presencia regular de ciertos patotipos de *E. coli*; así, un trabajo realizado en México sobre 130 muestras de ensaladas adquiridas en restaurantes observó la presencia de *E. coli* en 85 % de las muestras y de estas el 7 % eran positivas para algunos patotipos de *E. coli*: ETEC, EIEC y también STEC no O157 (Castro-Rosas et al., 2012) y otro estudio similar, en este caso sobre muestras de ensaladas con vegetales cocidos, mostraba un porcentaje de contaminación con *E. coli* del 72,3 % y un 4,1 % de muestras portadoras de los patotipos STEC, EPEC y ETEC (Bautista-De León et al., 2013).

#### 2.2.3.4 Pasos futuros

Las enfermedades gastrointestinales producidas por los diversos patotipos de *E. coli* ya representan un problema importante de salud y, a medida que los métodos de diagnóstico se estandaricen y se apliquen de forma rutinaria, es previsible que se incrementen. La transmisión de estos patotipos ocurre frecuentemente por la vía fecal-oral, y su presencia en aguas utilizadas para la producción de vegetales puede incrementar su incidencia en alimentos de origen vegetal, como sugiere la tendencia creciente observada en los últimos años (Callejón et al., 2015). Los estudios consultados muestran la presencia regular de patotipos de *E. coli* en muestras de ensaladas y otros productos vegetales listos para el consumo; la normativa Europea ya contempla la vigilancia de *E. coli* como indicador de contaminación fecal en esta categoría de alimentos, lo que podría servir de base para la monitorización de cepas patógenas.

Los patotipos de *E. coli* que mayor interés presentan para estudios prospectivos ya se han mencionado en este documento; asimismo es importante tener presente nuevas especies o patotipos

que se vayan definiendo. En este sentido, la especie *Escherichia albertii* es un patógeno emergente, portador del gen *eae*, implicado en las lesiones de “attaching and effacing” producidas por EPEC y EHEC, que se ha relacionado con brotes de enfermedad de transmisión alimentaria y que se ha aislado de algunos alimentos, como canales de pollo, aunque todavía no se han definido métodos normalizados de diagnóstico de este microorganismo (Nimri, 2013) (Lindsey et al., 2015).

Un último aspecto de interés futuro relacionado con *E. coli* es la creciente preocupación por la presencia de cepas portadoras de genes de resistencia a antimicrobianos en la cadena alimentaria, como las productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Aunque su presencia se ha estudiado principalmente en alimentos de origen animal, también se han detectado cepas resistentes, algunas de ellas con características patogénicas, en productos vegetales, que pueden ser por tanto un vehículo de transmisión de bacterias portadoras de genes de resistencia (van Hoek et al., 2015) (Skočková et al., 2015).

#### 2.2.4 *Clostridium difficile* en carne fresca

*C. difficile* es un microorganismo Gram positivo, esporulado y anaerobio que se encuentra habitualmente en el tracto intestinal del hombre y otros animales, pudiendo causar un espectro de enfermedades, denominado “infección por *Clostridium difficile*” (ICD) que va desde un cuadro leve de diarrea hasta colitis pseudomembranosa y, en ocasiones, sepsis, y que suele estar asociado a la administración de antibióticos (González-García et al., 2005) (Asensio y Monge, 2012).

##### 2.2.4.1 Identificación del peligro

*Clostridium difficile* es una bacteria esporulada anaerobia que se describió inicialmente como un componente habitual de la microbiota intestinal de neonatos, aunque al mismo tiempo también se observó su capacidad de producir toxinas de alta letalidad para ratones (Bartlett, 2008). A finales de la década de 1970 se comprobó su asociación con el desarrollo de colitis pseudomembranosa asociada al uso de antibióticos, y actualmente se considera la primera causa de diarrea nosocomial en países desarrollados; forma parte de la microbiota fecal normal del 1-3 % de residentes en la comunidad y en más del 20 % de adultos hospitalizados, tanto sintomáticos como asintomáticos, facilitándose el contagio en los hospitales, al tratarse de un entorno contaminado por esporas, y aumentado el riesgo en proporción a la duración de la hospitalización (Rodríguez-Pardo et al., 2013); además, en los últimos años se está detectando infecciones en pacientes sin contacto reciente con el sistema de atención sanitario (González-García et al., 2005) (Asensio y Monge, 2012). Recientemente se ha propuesto su reclasificación taxonómica, incluyéndolo es un nuevo género *Clostridio-**des*, aunque esto no supone ningún cambio en sus características patógenas (Lawson et al., 2016).

Se asume que la exposición a *C. difficile* se debe a la ingestión de esporas, dada su capacidad para sobrevivir en el ambiente y transmitirse de forma directa, por el contacto con portadores sintomáticos o asintomáticos, o indirecta por objetos contaminados (Asensio y Monge, 2012). Los alimentos podrían ser una fuente potencial de exposición, ya que se ha aislado de diversos tipos de animales de abasto, principalmente cerdos, y también de alimentos de origen cárnico, vegetales y productos de la pesca (Álvarez-Pérez et al., 2013) (National Food Institute, 2016) (Rodríguez et al.,

2016) (EFSA, 2017) (Brown y Wilson, 2018) (Candel-Pérez et al., 2018), aunque no se ha documentado ningún caso de enfermedad por transmisión alimentaria. La prevalencia media de *C. difficile* en carne y derivados cárnicos oscila entre el 0 y el 15 %. En estudios llevados a cabo en Estados Unidos y Canadá se obtuvieron valores de prevalencias entre el 20 y el 63 %, mientras que en Europa los valores fueron más bajos (0 a 6,3 %), sin quedar claro si se debía a diferencias estacionales, ya que la detección era más frecuente en las muestras tomadas en invierno, o a diferencias geográficas (Rodríguez et al., 2016) (Crobach et al., 2018). En el caso de los productos de la pesca, en Italia se han reportado tasas de aislamiento del 53 % en moluscos bivalvos, aunque no todas las cepas aisladas eran toxigénicas; en todos los casos correspondía a zonas de producción con una elevada contaminación (Pasquale et al., 2012). En vegetales listos para el consumo también se ha detectado *C. difficile* con una baja prevalencia (2,9 %) en Francia; su presencia en este tipo de alimentos puede deberse a una contaminación en origen u ocurrir durante el procesado (Eckert et al., 2013).

Parece que, al contrario de otras enfermedades de transmisión alimentaria causadas por especies del género *Clostridium*, como *C. perfringens*, no es necesario el crecimiento de *C. difficile* en el alimento y la infección se produciría por la ingestión de esporas que germinarían en el tracto gastrointestinal, estimuladas por la presencia de sales biliares (Warriner et al., 2017). El mecanismo de producción de la enfermedad comienza por la colonización intestinal, facilitada por la disrupción de la microbiota por un tratamiento antibiótico o por otros factores del paciente, como la edad avanzada o el uso de inhibidores de la acidez gástrica (Freeman et al., 2010) (Asensio y Monge, 2012). Esta disfunción de la microbiota intestinal permite la germinación de las esporas, ya que impide la conversión microbiana de los ácidos biliares primarios, activadores de la germinación de *C. difficile*, en ácidos secundarios, capaces de inhibirla (Brown y Wilson, 2018) (Crobach et al., 2018). Tras la colonización intestinal las células vegetativas producen dos toxinas: A (TcdA, enterotóxica) y B (TcdB, citotóxica), que son responsables de la mayoría de los síntomas de la enfermedad, produciendo lesiones en la mucosa intestinal y acumulación de fluidos. La mayor parte de las cepas aisladas de casos clínicos producen las dos toxinas, aunque hay un porcentaje pequeño de cepas clínicas que solamente producen la toxina B (Voth y Ballard, 2005) (National Food Institute, 2016) (Brown y Wilson, 2018). Algunas cepas de *C. difficile* producen una toxina binaria, denominada CDT, que está relacionada con manifestaciones clínicas graves, pero cuyo papel en el desarrollo de la enfermedad no está dilucidado y no se sabe con certeza si contribuye realmente a la virulencia o se trata de una molécula marcadora de cepas virulentas (National Food Institute, 2016) (Brown y Wilson, 2018).

Se diferencian varios tipos de cepas, en función de su virulencia y características moleculares. El tipo principal es el ribotipo 027, que se ha visto involucrado en brotes en América del Norte y en Europa y que está adquiriendo una importancia creciente; este ribotipo presenta una mutación en los genes reguladores de la producción de toxinas que hace que produzca más cantidad que otras cepas. También el ribotipo 078 se considera de elevada virulencia y es muy prevalente en Europa, además de infectar a pacientes más jóvenes y no siempre sometidos a tratamiento antibiótico (Freeman et al., 2010) (National Food Institute, 2016) (Brown y Wilson, 2018). En España hay pocos datos sobre los ribotipos circulantes; en un estudio realizado en 2009 en Barcelona se tipificaron 147 ce-

pas procedentes de 17 hospitales y observaron 48 ribotipos diferentes, siendo los más comunes el 241 (26 %), el 126 (18 %) y el 078 (7 %), sin que se detectara ningún 027 (Rodríguez-Pardo et al., 2013).

#### 2.2.4.2 Detección y vigilancia

Actualmente no existe ningún protocolo estandarizado para la detección de *C. difficile* a partir de muestras de alimentos. Tampoco el diagnóstico clínico está estandarizado, ya que las pruebas de laboratorio de detección de *C. difficile* no diferencian entre colonización asintomática e infección clínica y tienen que acumularse evidencias microbiológicas y clínicas (diarrea, ileo paralítico o megacolon tóxico) (Alcalá-Hernández et al., 2015). El diagnóstico de laboratorio clínico se suele basar en la detección antigénica de las toxinas A y/o B u otros antígenos de *C. difficile* y que están disponibles de forma comercial. También se han desarrollado métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos, sobre todo del gen de la toxina B (*tcdB*). En cuanto a técnicas de cultivo, se utilizan medios selectivos para el aislamiento a partir de muestras de heces, como agar CCFA (agar cicloserina, cefoxitina, fructosa) o CCEY (agar cicloserina, cefoxitina y yema de huevo); también se pueden utilizar medios no selectivos, enriquecidos con sangre y con taurocolato y lisozima, que facilitan la recuperación al aumentar la germinación de las esporas (Sorg y Sonenshein, 2008). Sin embargo, el cultivo no permite distinguir las cepas toxigénicas de las no toxigénicas, por lo que es necesario realizar pruebas adicionales de detección de las toxinas, que enlentecen el diagnóstico (Alcalá-Hernández et al., 2015).

Los diferentes estudios que abordan la detección de *C. difficile* en alimentos utilizan diferentes metodologías revisadas recientemente por Candel-Pérez et al. (2018), lo que hace difícil establecer comparaciones entre ellos. Es frecuente el utilizar tratamientos térmicos o con alcohol para inactivar células vegetativas contaminantes, así como caldos de enriquecimiento suplementados con agentes que estimulen la germinación de las esporas; finalmente, el aislamiento en medios sólidos emplea normalmente agentes antibióticos, como la cicloserina y la cefoxitina, junto con cultivo en condiciones anaerobias (Alcalá-Hernández et al., 2015) (Candel-Pérez et al., 2018). Ante la ausencia de un método estandarizado, algunos investigadores han propuesto un método de consenso para utilizarlo en el análisis rutinario de carnes en Estados Unidos. Dicho método consiste en un enriquecimiento de 10 g de muestra en 90 ml de caldo BHI (en el caso de piezas enteras, como pechugas de pollo o chuletas de cerdo se hace un enjuagado con agua de peptona tamponada que después se utiliza para inocular el caldo BHI), que se incuba a 35-37 °C durante 3-5 días; una alícuota de 1 ml se trata con 1 ml de etanol 95 % durante 1 hora, se centrifuga a 3 800 g/10 minutos, decantando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en el líquido restante y finalmente se inoculan los medios agar sangre anaerobio (anaBAP) y CCFA con taurocolato (CCFA-ST) con una gota del sedimento obtenido tras el tratamiento con alcohol, incubando en condiciones anaerobias a 35 °C durante 96 horas (Limbago et al., 2012). Este protocolo fue puesto a punto en tres laboratorios diferentes sobre muestras de carne picada inoculada experimentalmente con una concentración aproximada de 100 esporas/g y después se empleó para analizar 1 755 muestras de carne, con resultados negativos en todas ellas, aunque se detectaron otras especies del género *Clostridium*, lo que parece indicar que *C. difficile* no es un contaminante habitual en la carne en Estados Unidos (Limbago et al., 2012), aunque también puede ocurrir que el número de esporas presentes esté por

debajo del límite de detección (que no ha sido establecido en el método de Limbago et al. (2012)), ya que otros estudios llevados a cabo en Estados Unidos sobre carne y productos cárnicos indican una prevalencia bastante elevada (de más del 40 % en algunos casos) (Songer et al., 2009).

Precisamente la cuantificación del número de esporas de *C. difficile* presentes en los alimentos representa un problema adicional, ya que no existe ninguna recomendación sobre el número de esporas que sería aceptable en un alimento ni se han desarrollado métodos cuantitativos precisos. Los escasos estudios que abordan la enumeración de *C. difficile* en carne encuentran valores máximos de 20-33 esporas/g, aunque la relevancia clínica de estos resultados no se ha determinado y, en cualquier caso, hay que tener presente la elevada resistencia que presentan las esporas de *C. difficile* a los tratamientos utilizados en la preparación de los alimentos (Weese et al., 2009) (Knight et al., 2016).

Desde el punto de vista epidemiológico también es importante la tipificación de los microorganismos aislados. Para ello, hay disponibles diversas técnicas moleculares, siendo el ribotipado por PCR el método más extendido en Europa, mientras que la electroforesis en campo pulsado (PFGE) tiene mayor implantación en Estados Unidos. El uso de dos métodos diferentes de tipificación molecular da lugar a distintas formas de referirse a las cepas, dificultando el intercambio de datos interlaboratorio (Knetsch et al., 2013). Con el fin de solventar esta situación, se ha propuesto un protocolo estandarizado, basado en ribotipado por PCR con resolución mediante electroforesis capilar ("CE-PCR ribotyping"), cuyo principal inconveniente para su adopción universal es el equipamiento necesario para el análisis genético, aunque este tipo de equipos ya presentan un grado de implantación elevado en la mayoría de los centros de investigación epidemiológica (Fawley et al., 2015).

#### 2.2.4.3 Pasos futuros

Pese a la disparidad de datos reflejados en la bibliografía, parece que la contaminación de los alimentos con esporas de *C. difficile* es bastante común, aunque la concentración de las mismas sea baja (Songer et al., 2009) (Limbago et al., 2012). Asimismo, no hay datos sobre casos de enfermedad humana directamente relacionados con transmisión por alimentos, aunque la presencia de los mismos ribotipos en cepas aisladas de casos de enfermedad humana, alimentos y animales de abasto sugiere que los alimentos pueden suponer una vía potencial de infección (National Food Institute, 2016) (Warriner et al., 2017). Sería importante definir la dosis infectiva de esporas que pueden desencadenar la colonización, ya que no existe ninguna indicación al respecto; en el caso del botulismo infantil, infección provocada por la ingestión de esporas de *C. botulinum*, los estudios con modelos animales indican que la ingestión de 170 esporas (entre 80 y 360) produce la infección en el 50 % de los animales utilizados (Sugiyama et al., 1978). También habría que tener en cuenta cuales son las poblaciones más susceptibles ante la infección, entre las que estarían las personas mayores de 65 años y los pacientes en tratamiento antibiótico, pero también hay otros factores de riesgo, como el tratamiento con inhibidores de la acidez gástrica (inhibidores de la bomba de protones), terapias inmunosupresoras o pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal; asimismo, se ha observado un incremento en las tasas de infección en mujeres en el período alrededor del parto (Asensio y Monge, 2012).

El control de la presencia de *C. difficile* en los alimentos es difícil de abordar, dada la elevada resistencia de las esporas a los tratamientos culinarios, por lo que las estrategias se tienen que basar en reducir la contaminación a lo largo de todas las etapas de producción de alimentos. En este sentido, se ha propuesto el uso de vacunas en animales para disminuir los animales portadores y limitar el uso de antibióticos que puedan influir en la prevalencia de *C. difficile* en animales de abasto (National Food Institute, 2016) (Warriner et al., 2017). También es de gran importancia la implantación de medidas de higiene correctas en los trabajadores sanitarios, así como en los manipuladores de alimentos, mediante el lavado frecuente de las manos con agua y jabón, en lugar de utilizar desinfectantes con alcohol, que son inefectivos frente a las esporas de *C. difficile* (Rodríguez-Palacios et al., 2013) (National Food Institute, 2016). En la preparación de alimentos es importante realizar un tratamiento térmico de al menos 85 °C durante 10-15 minutos, aunque hay que tener presente que no es un tratamiento totalmente efectivo y los alimentos cocinados deben enfriarse y mantenerse a temperatura de refrigeración, igual que se recomienda para otros patógenos similares (Rodríguez-Palacios et al., 2013) (National Food Institute, 2016) (Candel-Pérez et al., 2018).

## 2.3 Parásitos

### 2.3.1 Protozoos: *Toxoplasma*

#### 2.3.1.1 Características generales e impacto

*Toxoplasma gondii* es el parásito protozoario de distribución geográfica mundial que causa toxoplasmosis, una infección zoonótica con importancia médica en pacientes inmunodeprimidos, mujeres embarazadas y recién nacidos infectados congénitamente. El diagnóstico rápido y preciso de la enfermedad y, consecuentemente, el tratamiento adecuado y eficaz son esenciales.

Se estima que un 30 % de la población mundial es seropositiva (Scallan et al., 2011) y que los alimentos contribuyen entre el 42 y 61 % de todos los casos, dependiendo de la zona geográfica (Belluco et al., 2017). La principal vía de transmisión para *T. gondii* es la oral, siendo la fuente de infección más importante la carne cruda o poco cocida, además de vegetales de IV gama. La leche se considera una potencial fuente de infección, ya que el parásito infeccioso en su forma taquizoito puede ser transmitido por fluidos animales. Cualquiera que sea la fuente alimenticia, los hábitos de consumo juegan un papel crítico, ya que *T. gondii* se puede inactivar a través de la cocción, congelación y la salazón, dependiendo de las características del producto.

Los humanos, así como prácticamente todos los animales de sangre caliente, incluidos los mamíferos y las aves, pueden ser infectados por este parásito intracelular. Aunque casi todos los animales de sangre caliente pueden actuar como hospedadores intermediarios, el ciclo de vida del parásito sólo se completa en gatos y otros felinos (incluyendo el lince en Europa), único huésped definitivo capaz de facilitar la propagación sexual del parásito. Los felinos pueden difundir millones de ooquistes durante la infección primaria, causando una enorme contaminación ambiental ya que después de la esporulación, los ooquistes son infecciosos para los hospedadores accidentales al ingerir productos contaminados.

La infección primaria con *T. gondii* en individuos con el sistema inmunitario sano generalmente aparece con síntomas leves como la gripe, mientras que en los pacientes con el sistema inmunitario

deprimido puede causar infecciones potencialmente mortales. El impacto de *T. gondii* en individuos sanos no está claro, pero sabe que el parásito puede enquistarse en los tejidos con potencial de reactivación durante periodos de inmunodepresión. Además, la transmisión trans-placentaria de *T. gondii*, cuando la infección primaria se adquiere durante el embarazo, puede causar serios problemas como aborto, alumbramiento de mortinato o malformaciones fetales graves. Recientemente, la toxoplasmosis se considera un factor de riesgo para trastornos neurológicos y psiquiátricos. Por ello, el diagnóstico de toxoplasmosis es crítico en cuatro grupos de individuos; pacientes inmunodeprimidos como infectados por VIH o pacientes trasplantados de órganos, mujeres embarazadas que adquieren la infección durante el embarazo, fetos y recién nacidos congénitamente infectados, y aquellos con retinocoroiditis (Rostami et al., 2018).

Las manifestaciones clínicas de la infección por *T. gondii* son inespecíficas; tradicionalmente el diagnóstico de la toxoplasmosis se ha basado en pruebas de laboratorio, en particular serológicas y bioensayos. Pero la variabilidad en la sensibilidad y especificidad de estas pruebas, el tiempo requerido y la imposibilidad para diferenciar entre las cepas de parásitos ha llevado al desarrollo y empleo de nuevas técnicas serológicas, moleculares y de imagen para el diagnóstico rápido y preciso de la enfermedad. El análisis por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) fue el principal método usado en el siglo pasado. Métodos basados en ELISA mejorados como quimioluminiscencia (CLIA), ensayo de fluorescencia ligado a enzimas (ELFA), ensayo inmunocromatográfico (ICT), ensayo de avidéz por IgG plasmático y ensayos de aglutinación del inmunoadsorbente (ISAGA) han demostrado alta sensibilidad y especificidad. Estudios recientes empleando antígenos recombinantes o quiméricos y el método de péptidos multiepítipo han demostrado resultados muy prometedores en el desarrollo de nuevas estrategias capaces de discriminar infecciones recientemente adquiridas de una infección crónica. La polimerización en cadena (PCR) en tiempo real y la amplificación isotérmica lazo-mediada (LAMP) son dos métodos de PCR recientemente desarrollados con alta sensibilidad y especificidad que podrían ser útiles para el diagnóstico precoz de la infección. Las técnicas de imagen como tomografía computarizada (CT), imagen por resonancia magnética (MRI), imagen nuclear y la ultrasonografía (US) son útiles para el diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral y ocular, aunque sus resultados independientemente no serían específicos (Rostami et al., 2018).

Los métodos desarrollados recientemente con mayor sensibilidad para el diagnóstico de la toxoplasmosis como son la serología, técnicas moleculares y de imagen tienen sus ventajas y limitaciones pero su combinación puede lograr resultados precisos y efectivos. Para este propósito, se sugiere que ELISA de IgG/IgM en combinación con RT-PCR/LAMP en fluido amniótico y ultrasonografía prenatal para la detección de la infección aguda en mujeres embarazadas y también como medida preventiva de transmisión congénita. Detección serológica (por ELISA usando antígeno lisado de *Toxoplasma* (TLA), antígenos recombinantes o quiméricos) es el patrón perfecto en los recién nacidos, aunque RT-PCR/LAMP en sangre del cordón o sangre entera puede ser útil para el diagnóstico definitivo. Además, la combinación de ELISA (usando TLA, antígenos recombinantes o quiméricos), RT-PCR/LAMP en fluido cerebroespinal (CSF) y detección por imagen por MRI o CT podrían dar un diagnóstico definitivo en pacientes inmunocomprometidos (Rostami et al., 2018).

En Estados Unidos, *T. gondii* se incluye entre los 31 agentes patógenos causantes de 9,4 millones de episodios de enfermedad alimentaria, responsable de un 8 % de las principales causas de hospitalización y 24 % de las muertes (Scallan et al., 2011).

La notificación de los brotes en alimentos de la toxoplasmosis humana es obligatoria según la Directiva de zoonosis 2003/99/CE (UE, 2003) (traspuesta mediante el Real Decreto 1940/2004). Aunque la toxoplasmosis congénita se reporta al ECDC, los sistemas de vigilancia nacional de esta infección difieren entre países, y sólo tres países miembros (República Checa, Francia y Eslovaquia) tienen una vigilancia activa de toxoplasmosis congénita cubriendo a toda la población. En 18 países miembros e Islandia, es obligatorio implementar un sistema de vigilancia, el Reino Unido tiene un sistema voluntario y España tiene otro sistema no especificado. Por ello, no es posible hacer una buena estimación de la prevalencia de toxoplasmosis congénita en la UE.

Pese a que la toxoplasmosis congénita sigue siendo una enfermedad rara en la UE, en 2016 se reportaron 47 casos en 19 países miembros. Excluyendo los datos de Francia, el número de casos reportados es comparable con el número anual de casos (un promedio de 40 casos/año) y tasa de notificación de 1,48 casos por 100 000 habitantes en 2012-2015. Francia reportó las tasas de notificación más altas en 2012-2015, con un aumento significativo de 142,2 % de 12,7 a 30,8 casos por 100 000 habitantes. En 2016, las tasas de notificación más altas fueron en Polonia, Eslovenia y Eslovaquia con 5,42, 4,84 y 3,60 casos por 100 000 habitantes, respectivamente (EFSA, 2017).

### 2.3.1.2 Datos de prevalencia en alimentos

Recientemente, la OMS ha informado que la toxoplasmosis transmitida por los alimentos se ha extendido por carne cruda o poco cocida y productos frescos, causando hasta el 20 % de la carga total de enfermedades transmitidas por alimentos en la UE y afectando a más de un millón personas en Europa cada año (OMS, 2015).

En una revisión sistemática y meta-análisis de estudios de casos controlados realizada por Belluco et al. (2017), con limitaciones por el reducido número de casos, se indica el riesgo de infección aguda de *T. gondii* de tres matrices alimenticias diferentes, consumo de carnes crudas o poco cocidas (sin diferenciar la procedencia animal) *Odds ratio* (OR) 3,44 (1,11-9,16), consumo de carne de vacuno cruda o poco cocida OR 2,22 (1,57-3,12), y el consumo de carne de oveja cruda o poco cocida, OR 3,85 (1,85-8,00). Sin embargo, el consumo de cerdo crudo o poco cocido, los huevos crudos y la leche no pasteurizada resultaron no ser factores de riesgo significativos.

Según la información de los países miembros de la UE en 2016, la mayoría de las especies ganaderas están infectadas por *Toxoplasma*. Sin embargo, no se pueden sacar conclusiones epidemiológicas para evaluar los riesgos para seres humanos por el reducido tamaño de las muestras. El número total de muestras testadas de oveja y de cabra (muestras clínicas y de vigilancia/supervisión) representa sólo una pequeña fracción de la población de ovejas (85,5 millones) y cabras (12,5 millones) en la UE, respectivamente (Eurostat, 2016).

La detección de anticuerpos específicos de *Toxoplasma*, así como la detección del DNA del parásito, no implica un riesgo directo para los consumidores; de hecho no hay una correlación directa entre la presencia de anticuerpos y/o DNA y la infectividad del parásito. Además, como los quistes

tisulares no están uniformemente distribuidos en los tejidos comestibles, un resultado negativo obtenido por un método de detección directa en un animal serológicamente positivo, no puede excluir la presencia de quistes infecciosos en otras porciones comestibles.

Los datos bibliográficos indican una alta incidencia de la toxoplasmosis por contacto parásito-animal (ovejas, cerdos, cabras, caballos, pequeños mamíferos incluyendo roedores, animales domésticos y animales salvajes) sugiriendo que el control de este parásito es extremadamente difícil y sólo es posible en ganado criado bajo condiciones de estabulación estrictas. Así, estudios recientes en cerdos muestran un descenso importante en las últimas décadas de la prevalencia de *Toxoplasma* en cerdos comercializados; sin embargo, se espera un aumento en la prevalencia debido al aumento de animales criados en régimen extensivo (Dubey, 2009) (Papini et al., 2017). La alta incidencia de *Toxoplasma* en ovinos (21 %) y cabras (9 %) podría explicarse, en parte, por su comportamiento alimentario. Las ovejas podrían ser más susceptibles a *Toxoplasma* en comparación con el resto de ganado, aunque la alta positividad de anticuerpos específicos de *Toxoplasma* utilizando pruebas indirectas parece ser resultado de la vacunación.

Ciertos factores de riesgo se asocian con mayor riesgo de transmisión de animales a humanos como la presencia de gatos en granja y prácticas de cría al aire libre y en granja (Opsteegh et al., 2016).

Se dispone de información limitada sobre la contaminación de hortalizas, frutas y agua potable por ooquistes de *Toxoplasma* en la UE. En 2016, ningún país miembro informó sobre investigaciones en estas matrices.

Por último, las pruebas de detección directas e indirectas para *Toxoplasma* no proporcionan evidencias para distinguir entre una infección por ingesta de carne infectada con quistes tisulares y una ingesta de alimentos contaminados por ooquistes de gatos. Entender las vías de transmisión mejoraría la evaluación de riesgo para este parásito alimentario y facilitaría la identificación de las medidas de control.

### 2.3.1.3 Metodologías disponibles

En la UE no existe reglamentación sobre la vigilancia y monitorización de *Toxoplasma* en animales, por lo que la información disponible viene determinada por la legislación nacional de cada país miembro. Así, la detección de *Toxoplasma* en animales varía según el país, en función de los métodos de diagnóstico utilizados, así como de las diferentes matrices analizadas. También debe tenerse en cuenta que tanto la edad de los animales como los sistemas de producción a nivel de granja influyen en la prevalencia de *Toxoplasma*.

Las principales especies animales testadas son los pequeños ruminantes (cabra y oveja), bovinos, porcinos y animales de compañía (gatos y perros) utilizando muestras de abortos de animales (ruminantes) así como de investigaciones clínicas. En 2016, los métodos de diagnóstico indirectos (serológicos) utilizados para la detección de *Toxoplasma* en animales fueron test de aglutinación en látex (LAT), ELISA, inmunofluorescencia (IFA) y test de fijación de complemento (CFT) mientras que los métodos directos fueron histología, inmunohistoquímica, PCR y PCR en tiempo real. Los primeros se utilizan para la detección de anticuerpos específicos de *Toxoplasma* en suero o muestras

de jugo de carne mientras que los segundos se aplican a órganos o a tejidos. Se detectó una mayor prevalencia mediante pruebas diagnósticas indirectas (20 %) que directas (6,1 %). La prevalencia fue más alta en pequeños rumiantes (ovinos y caprinos; alrededor del 9 %) seguida de bovinos (alrededor del 3 %) y cerdos (alrededor del 2 %).

La mayoría de los países miembros usan métodos indirectos para detectar *Toxoplasma*. Opsteegh et al. (2016) realizaron una comparación entre los métodos de detección directa e indirecta y concluyeron que la detección basada métodos indirectos no se recomienda para detectar *T. gondii* viable en bovinos y equinos, sino que en estas especies se recomiendan métodos de detección directa. Para cerdos, aves de corral y pequeños rumiantes los métodos serológicos podrían ser útiles para la detección de animales/rebaños de alto riesgo, pero no como un indicador para la infección en un animal individual. Además, los métodos directos deben aplicarse sobre matrices tomadas post mortem ya que se demostró que la carga del parásito en diferentes músculos esqueléticos en ovejas y cerdos no varía mucho, encontrándose el parásito mayoritariamente en el cerebro, tejido cardíaco y pulmonar.

Se debe tener en cuenta que los métodos directos son caros y pueden aplicarse en una pequeña cantidad de tejido, y por lo tanto, utilizarse sólo en un número muy limitado de muestras que pueden no ser representativas de la población objetivo, dificultando la obtención de datos epidemiológicas fiables. Además de los métodos de detección directos, es importante la identificación de cepas ya que su patogenicidad y virulencia para los humanos varía entre los genotipos y las cepas atípicas.

#### 2.3.1.4 Pasos futuros

El consumo de carne de vacuno o de oveja cruda o poco cocida es una fuente importante de transmisión de *T. gondii* a los seres humanos como muestran los estudios epidemiológicos. Es importante tener en cuenta este riesgo, especialmente en personas de riesgo, debido a los efectos severos de la toxoplasmosis en circunstancias particulares. En general, es necesaria la cocción adecuada de la carne de todas las especies y se debe tener precaución en el consumo de carne poco cocida, debido al efecto desconocido de los bradizoitos de *T. gondii* enquistados crónicamente (Belluco et al., 2017).

Un protocolo armonizado para la recolección de muestras y la detección de *T. gondii* mejoraría los estudios sobre la prevalencia de las diferentes especies ganaderas de la UE.

Para obtener datos epidemiológicos adecuados sobre la circulación de este patógeno entre las diferentes especies ganaderas en los países miembros, debe estandarizarse un protocolo para la recolección de muestras y detección del parásito. Además, cuando se establezca un esquema de muestreo debe tenerse en cuenta importantes variables epidemiológicas como son: especie, edad del sector de producción, condiciones de crianza (animales de caza de rango libre, cría al aire libre o de interior), contacto con gatos o roedores si los animales son criados en interior, información sobre recurso de agua y tipo de alimentación, que pueden ser contaminados por heces de gato y consecuentemente por ooquistes de *Toxoplasma*, si no son controlados o tratados adecuadamente.

Los estudios sobre factor de riesgo deben basarse en datos obtenidos por métodos directos en lugar de métodos indirectos. Para controlar el riesgo de *Toxoplasma* y proponer estrategias de intervención en el ganado (por ejemplo, vacunación), es importante recolectar y analizar información

obtenida de investigaciones epidemiológicas y encuestas que estandarizan la matriz de la muestra (cerebro, corazón, pulmones), el método analítico (métodos directos preferentemente) y la población diana (especies y categorías de riesgo).

### 2.3.2 Protozoos: *Cryptosporidium*

#### 2.3.2.1 Características generales

*Cryptosporidium* es un género de parásitos protozoarios perteneciente al *subphylum* Apicomplexa. Aunque la ubicación del género *Cryptosporidium* ha sido controvertida, la clasificación más reciente lo considera como un grupo separado dentro de este taxón (Adl et al., 2012). Actualmente, el género comprende 25 especies, muchas de las cuales son relativamente específicas de hospedador, y aproximadamente el 50 % de las especies tienen algún grado de potencial zoonótico, lo que significa que tienen el potencial de infectar a los humanos así como a especies animales domésticas.

*C. hominis*, se asocia casi exclusivamente con infección en humanos, y la mayoría de las infecciones en el hombre se deben a la infección con esta especie o con una especie menos específica de hospedador, *C. parvum*. Otras especies importantes como patógenos humanos incluyen *C. meleagridis*, que se asocia principalmente con infecciones en pavos, pero también se ha identificado con relativa frecuencia en niños en América del Sur, y *C. cuniculus*, asociado con infecciones en conejos, pero también agente etiológico en un brote de criptosporidiosis transmitida por el agua. Algunas especies de *Cryptosporidium* solo se han asociado con casos esporádicos de infección humana (por ejemplo, *C. ubiquitum*, que se asocia más habitualmente con infecciones en ovino y cérvidos) o están particularmente asociadas con infecciones en pacientes inmunocomprometidos (por ejemplo, infecciones por *C. suis*, que es generalmente diagnosticado en infecciones en cerdos, e infecciones por *C. felis*, más comúnmente asociadas con infecciones en gatos).

El ciclo vital de *Cryptosporidium* es directo (sin hospedador intermedio) pero, no obstante, es bastante complejo y contiene tanto un ciclo sexual como un ciclo asexual. La etapa de transmisión es el ooquiste. Estos son la única etapa exógena y se excretan en las heces de los huéspedes infectados. Son esféricos, alrededor de 3-5,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, y tienen una pared resistente de 50 nm de grosor con tres o cuatro capas, con una capa interna de glicoproteína que parece proporcionar fuerza y flexibilidad (Jenkins et al., 2010). Cada ooquiste contiene cuatro esporozoitos desnudos, que se desarrollan y son totalmente infecciosos tras la excreción (a diferencia de otros géneros de Apicomplexa como *Eimeria* spp., *Cystoisospora* spp. o *Toxoplasma gondii*, donde los esporozoitos están envueltos y requieren un período de desarrollo en el medio ambiente después de la excreción). La infección con *Cryptosporidium* se inicia cuando un hospedador susceptible ingiere un ooquiste viable. Esto puede ser por ingestión fecal-oral directa, o a través de un vehículo como el agua o alimentos contaminados. La dosis infectiva es, teóricamente, un solo ooquiste; sin embargo, no todas las especies de *Cryptosporidium* y no todas las cepas o subtipos de una especie son igualmente infecciosas para los humanos. Así, diferentes estudios han establecido dosis infectivas para *C. hominis* y *C. parvum* en el rango de 10 a 100 ooquistes. Sin embargo, los análisis de dosis-respuesta no deben limitarse a las consideraciones del parásito ya que las variaciones del hospedador también pueden tener relevancia (Teunis et al., 2002a, b).

Cuando los ooquistes viables son ingeridos por un huésped susceptible, generalmente los esporozoitos se liberan en el intestino delgado donde invaden las células epiteliales y se localizan epitelialmente y se desarrollan a la etapa de trofozoíto. Los ciclos repetidos de reproducción asexual dan como resultado la producción de grandes cantidades de merontes, que se dividen para formar merozoítos, y cada merozoito maduro abandona el meronte para infectar a otra célula huésped, con la consiguiente destrucción de la célula huésped inicial. Este ciclo asexual resulta en una enorme multiplicación de los parásitos. El ciclo sexual involucra el desarrollo de microgametos y macrogamontes, con microgametos producidos a partir de los microgamontes que fertilizan el macrogamonte, y que finalmente resultan en la producción de ooquistes. Los ooquistes se esporulan mientras están dentro del huésped y pueden escindir-se dentro del mismo huésped, dando como resultado la reinvasión de las células epiteliales y la continuación de la infección. Alternativamente, los ooquistes se excretan en las heces y son inmediatamente infecciosos para el siguiente huésped. Debido al ciclo asexual, que resulta en una gran multiplicación del parásito, miles de ooquistes se excretan de un huésped infectado; más de  $1 \times 10^5$  ooquistes en adultos sanos e inmunocompetentes (Chappell et al., 1996), o incluso más de  $10^9$  ooquistes en pacientes con SIDA con criptosporidiosis sintomática (Goodgame et al., 1993).

La criptosporidiosis es una enfermedad entérica. Los síntomas comúnmente comienzan alrededor de 1 semana después de la infección, pero también se han descrito períodos de incubación que varían desde 1 día a 2 semanas. Suele ser autolimitada en individuos inmunocompetentes, pero se ha descrito una alta tasa de recaída (Hunter et al., 2004a). Los síntomas se caracterizan por diarrea acuosa, a menudo voluminosa y a veces mucóide, pero rara vez sanguinolenta, dolor abdominal, náuseas y vómitos. La diarrea generalmente es aguda, pero también puede ser persistente. Sin embargo, en algunas personas, la infección puede ser en gran medida asintomática. También se han descrito otros síntomas extraintestinales (dolor en las articulaciones, dolor en los ojos, dolor de cabeza) generalmente asociados con la infección por *C. hominis* (Hunter et al., 2004). Asimismo, *Cryptosporidium* es uno de los cuatro principales agentes etiológicos asociados con la diarrea infantil grave en los países en desarrollo (Kotloff et al., 2013). Los síntomas a menudo son más graves en pacientes inmunodeprimidos y la infección puede volverse crónica, debilitante y potencialmente mortal, con altos volúmenes de diarrea, posibilidad de propagación de la infección más allá del sitio primario y pérdida de peso.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* son extremadamente robustos. Pueden sobrevivir durante períodos prolongados en condiciones húmedas y frías en las que generalmente se almacenan productos frescos, y también pueden sobrevivir en condiciones más adversas, como el contacto con el cloro. Sin embargo, son susceptibles a la desecación, el calentamiento y la congelación-descongelación, así como a algunos tipos de irradiación, incluida la ultravioleta, y algunos tratamientos químicos. Esto significa que para los productos alimenticios destinados a la alimentación con un procesamiento mínimo (sin cocción) para conservar sus cualidades sensoriales es preferible evitar la contaminación original. El medio más eficaz para controlar dicha contaminación en los productos frescos es la aplicación de buenas prácticas agrícolas (BPAs) durante la producción primaria, Buenas Prácticas de Fabricación (BPFs) durante el procesado y la Buena Práctica Higiénica (BPH)

antes del consumo (Dawson, 2005). Las BPAs incluyen el uso de agua no fecal para el riego, la aplicación de fertilizantes y plaguicidas, así como la prevención de que los animales domésticos no pasten o contaminen las áreas hortícolas y los animales silvestres no tengan acceso a estas áreas de cultivo. Los tratamientos previos de las aguas residuales antes del uso para el riego pueden reducir la cantidad de patógenos viables, incluidos los ooquistes de *Cryptosporidium*, que de lo contrario podrían contaminar los productos frescos. Los tratamientos adecuados incluyen la irradiación UV y el tratamiento con ozono (Kalisvaart, 2004) (Orta de Velásquez et al., 2006). También se ha demostrado que la ultrafiltración de membrana con un sistema de fibra hueca sumergida es adecuada (Lonigro et al., 2006).

Durante el procesado de alimentos también se debe usar agua potable (Sutthikornchai et al., 2005) y si el agua de lavado se reutiliza, los procedimientos de desinfección deben ser efectivos para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium*. También se debe tener en cuenta que los procedimientos de lavado en sí mismos pueden ser ineficaces para eliminar los ooquistes en productos frescos. Si no se puede evitar la contaminación y la eliminación por lavado u otros procedimientos es ineficiente, entonces se debe aplicar procedimientos de inactivación para garantizar la seguridad microbiológica de los alimentos.

El desinfectante más comúnmente utilizado es tradicionalmente el cloro. La eficacia de la cloración estándar para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium* en productos frescos depende de una variedad de factores, incluido el tiempo de contacto. En particular, para algunos productos más delicados, como fruta blanda (por ejemplo, fresas y frambuesas), la forma de tratamiento puede proporcionar un tiempo de contacto insuficiente para su inactivación efectiva. Por otro lado, el empleo de dicloroisocianurato de sodio (NaDCC) en la inactivación de varios protozoos intestinales, incluidos los ooquistes de *Cryptosporidium* en productos frescos vegetales y frutas crudas, puede ser adecuado para uso a nivel de hogar y restaurante, así como en la industria de *catering* (El Zawawy et al., 2010). Otros desinfectantes que pueden ser apropiados para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium* en productos frescos incluyen el dióxido de cloro gaseoso (Ortega et al., 2008), y una combinación de ácido levulínico y dodecil sulfato de sodio (SDS) (Ortega et al., 2011). La investigación de la última técnica de desinfección se basó en la reducción de más de 6 log de los patógenos bacterianos (*Salmonella* y *E. coli* O157) en la lechuga (Zhao et al., 2009). Otras tecnologías que pueden ser útiles para usar en la industria de productos frescos para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium* incluyen la irradiación (UV, cobalto-60), el tratamiento con altas presiones hidrostáticas y la ozonización. Cabe señalar que el uso de tratamientos de inactivación secuencial podría optimizar los tratamientos existentes a través de efectos sinérgicos (Erickson y Ortega, 2006).

*Cryptosporidium* no sobrevive bien en bebidas carbonatadas (Friedman et al., 1997), y la pérdida de viabilidad también se ha observado en la cerveza (incluida la sin alcohol), asociándose a un pH bajo. Por otro lado, se ha demostrado que la pasteurización a alta temperatura-tiempo corto (HTST) inactivó con éxito los ooquistes de *Cryptosporidium* (Harp et al., 1996). Asimismo, los ooquistes viables en la leche no se inactivan por el proceso de fermentación utilizado para la fabricación de yogur; sin embargo, el proceso de mezcla y congelación en la fabricación de helados provoca aparentemente la pérdida completa de la viabilidad (Deng y Cliver, 1999). Además, se ha comprobado

que diferentes métodos de inactivación como presiones ultraelevadas (Slifko et al., 2000), pasteurización HTST (Deng y Cliver, 2001), irradiación UV (Hanes et al., 2002) y ácidos orgánicos combinados con peróxido de hidrógeno son efectivos en sidra (Kniel et al., 2003).

### 2.3.2.2 Distribución y prevalencia

*Cryptosporidium* spp. tiene una distribución global describiéndose infecciones humanas en más de 100 países (Fayer, 2008). Aunque las estimaciones de prevalencia varían entre países, entre grupos de edad y entre estudios, es evidente que los niños en los países en desarrollo son los más afectados (Shirley et al., 2012); se ha sugerido que la criptosporidiosis es responsable de alrededor del 20 % de los casos de diarrea infantil en los países en desarrollo (Mosier y Oberst, 2000), y en 2004, el vínculo común de la criptosporidiosis con la pobreza fomentó su inclusión en la "Iniciativa de enfermedades desatendidas" de la OMS (Savioli et al., 2006). En Europa, el ratio de notificación de criptosporidiosis en humanos es de 3,1 casos por cada 100 000 habitantes (ECDC, 2018), pero existe una clara heterogeneidad en los resultados de prevalencia. Mientras que varios países como Irlanda, Reino Unido, o Suecia presentan una prevalencia superior a 5 casos por cada 100 000 habitantes, la mayoría del resto de los países que envían información al ECDC reportan menos de 90 casos, y varios países ni siquiera informan de esta infección (ECDC, 2018). Sin embargo, la tasa más alta confirmada de casos también se encuentra en el grupo de edad de 0 a 4 años (12,6 casos por 100 000 habitantes) (ECDC, 2018).

### 2.3.2.3 Metodologías disponibles

El diagnóstico de la criptosporidiosis por lo general se asocia al hallazgo de ooquistes (o, con menor frecuencia, sus antígenos o ADN) en muestras fecales. Aunque la detección basada en anticuerpos en suero, saliva o heces también es posible para demostrar la exposición a *Cryptosporidium*, solo tiene un beneficio diagnóstico adecuado si se demuestra la seroconversión, ya que de lo contrario un resultado positivo puede indicar también una exposición pasada.

En muestras fecales, se usan generalmente técnicas de concentración con formol-éter (acetato de etilo) o la flotación (a menudo sacarosa o cloruro de sodio) antes de la microscopía. Como los ooquistes son muy pequeños, se recomienda el uso de una técnica de tinción, particularmente el uso de anticuerpos marcados con un fluorocromo y cribado con microscopía de fluorescencia (prueba de inmunofluorescencia de anticuerpos, IFAT). El IFAT se considera la técnica de referencia, aunque otras técnicas como la tinción de Ziehl-Neelsen (mZN) modificada o la auramina fenólica también pueden emplearse. Sin embargo, algunos métodos de tinción de ooquistes no funcionan bien en ooquistes que se han conservado en fijadores de alcohol polivinílico, y se ha descrito una falta de sensibilidad y especificidad provocando una sobreestimación de la prevalencia de la infección cuando se ha empleado una tinción con mZN (Chang'a et al., 2011). Asimismo, existen técnicas inmunológicas, principalmente técnicas de ELISA, empleándose los tests inmunocromatográficos como pruebas rápidas de una manera rutinaria. La principal desventaja de estos tests rápidos, además de su relativamente alto coste, es tanto su baja sensibilidad como especificidad (Johnston et al., 2003) (Robertson et al., 2006). Sin embargo, las pruebas son muy simples de usar y proporcionan resultados en minutos. Los métodos moleculares, y principalmente la detección específica del ADN

del parásito en muestras de heces utilizando PCR a tiempo real es probable que se convierta en el método de elección, especialmente si se emplea sistemas de PCR múltiple que permita la detección simultánea de diferentes patógenos entéricos (Stensvold et al., 2011). Una revisión reciente de los métodos actuales para la detección e identificación de ooquistes en muestras fecales ha sido realizada por Ahmed y Karanis (2018a).

La detección de la contaminación del agua o alimentos por ooquistes de *Cryptosporidium*, se basa en aislar e identificar los ooquistes, o su ADN. Sin embargo, la concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* en una muestra fecal de un individuo infectado es considerablemente mayor y por lo tanto la detección en alimentos o agua es mucho más difícil. Por esta razón, el diagnóstico de infección por *Cryptosporidium* mediante la identificación de ooquistes en muestras fecales y la detección de contaminación mediante la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras de alimentos no son del todo comparables.

La detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en el agua potable implica la concentración de partículas que son aproximadamente del tamaño de ooquistes de *Cryptosporidium* (o más grandes) de una muestra de agua relativamente grande (mínimo de 10 l) por filtración (también se pueden usar floculación y sedimentación, pero se usan con menos frecuencia, o se puede usar también centrifugación de flujo continuo), eluyendo estas partículas del filtro a un volumen más pequeño a menudo por centrifugación, y luego aislando los ooquistes antes de la detección. La detección de los ooquistes generalmente se realiza secando el concentrado final de alrededor de 50 µl en un portaobjetos de microscopio y examinándolo con IFAT. El marcador fluorescente del anticuerpo monoclonal utilizado suele ser el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y, adicionalmente se emplea usualmente la tinción de los núcleos de los esporozoitos con 4',6 diamidino-2-fenilindol (DAPI) para mejorar la detección proporcionando marcadores visuales adicionales para la identificación.

En principio, la aproximación para analizar la contaminación de alimentos con ooquistes de *Cryptosporidium* es similar a la empleada para el agua. Sin embargo, no es posible filtrar un gran volumen (la filtración de líquidos coloidales, como la leche, tampoco es práctica) y, en su lugar, se debe utilizar algún tipo de procedimiento de elución. Esto significa que sólo puede analizarse una cantidad de producto relativamente más pequeña. Asimismo, las variaciones en las características bioquímicas y físicas de los diferentes alimentos hacen inviable una estrategia horizontal ya que un método apropiado para un tipo de alimento puede resultar en eficiencias de recuperación que son subóptimas en otros. Ahmed y Karanis (2018b) resumen los diferentes métodos usados para la recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium* a partir de cada matriz alimentaria, además de revisar las ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos para su recuperación y los factores que afectan a la eficiencia de la misma. La IFAT sigue siendo el método de elección para la detección y es el método designado en la Norma ISO 18744:2016 para su análisis de vegetales y bayas para *Cryptosporidium* (ISO, 2016). Es sorprendente que la IFAT (que es básicamente un sistema de detección basado en microscopía) no haya sido sustituida por una técnica como la PCR en tiempo real o el LAMP, particularmente cuando el equipo requerido para IFAT, un microscopio de fluorescencia, es muy costoso, mientras que los equipos de PCR tienen precios cada vez más competitivos y, además, brinda la oportunidad de identificar simultáneamente distintas especies. Sin embargo, la presencia

de distintos tipos de inhibidores de la PCR y la incapacidad de detectar parásitos no nucleados hacen que estas técnicas no estén totalmente implantadas en los laboratorios de alimentos.

#### 2.3.2.4 Pasos futuros

*Cryptosporidium* es un parásito reconocido como uno de los principales causantes de enfermedad diarreica transmitida por el agua en los seres humanos en todo el mundo, con consecuencias a largo plazo, como la desnutrición, el retraso en el crecimiento y los déficits cognitivos en niños pequeños en entornos con recursos limitados, y que causa infecciones oportunistas en huéspedes inmunodeprimidos. A pesar de la carga mundial de la criptosporidiosis, las opciones de tratamiento se limitan a la terapia de apoyo y a un solo medicamento, nitazoxanida, que inhibe la enzima piruvato ferridoxin oxidorreductasa (PFOR) interrumpiendo el metabolismo del parásito, pero que tiene una eficacia limitada en niños desnutridos y es ineficaz en individuos inmunodeprimidos. La búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas está enormemente dificultada por la notoria intratabilidad del parásito y la limitación de herramientas técnicas para su estudio. Aunque se han logrado avances significativos en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la criptosporidiosis, algunos de los candidatos no eliminan el desprendimiento de ooquistes, reducen moderadamente la gravedad o la duración de la diarrea (o ambas), o no se ha evaluado su toxicidad ni se han evaluado en ensayos preclínicos. Hasta la fecha, ninguno de los medicamentos ha alcanzado la etapa de ensayo clínico en humanos. No obstante, se podrían desarrollar nuevos análogos con mayor eficacia y menor toxicidad para las células humanas (Bhalchandra et al., 2018).

Este parásito intestinal transmitido por agua y alimentos representa una amenaza para la salud humana incluso en los países industrializados. Las pruebas de diagnóstico presentan limitaciones en cuanto a rendimiento, coste, tiempo, disponibilidad, etc. La elección del método más adecuado y preciso para la detección de *Cryptosporidium* es una decisión difícil. Existe una gran variedad de métodos, desde sencillos a altamente complejos, para la detección e identificación de *Cryptosporidium* en heces, siendo los más sensibles la inmunofluorescencia directa y el diagnóstico molecular (PCR, PCR en tiempo real, LAMP). Las heces son el material más sencillo de procesar y la confirmación visual de ooquistes en el examen microscópico despeja toda duda de infección, si bien tiene un valor limitado para identificar especies de ooquistes y evaluar el estado del paciente. Se recomienda la estandarización y validación de procedimientos en los diferentes laboratorios.

Sin embargo, no hay métodos de detección estándar de los ooquistes de *Cryptosporidium* en los alimentos y se requiere personal experto para asegurar tanto el control como la detección, por lo que se deben utilizar métodos complementarios teniendo en cuenta sus limitaciones. La mayoría de métodos disponibles, adaptados de los utilizados para aguas, incluyen la detección convencional o de estrategia molecular, estos últimos mucho más sensibles, rápidos y fáciles de realizar que los microscópicos, y con posibilidad de diferenciar especies y genotipos. Se han mejorado los métodos para ciertos alimentos “de alto riesgo” (especialmente ensaladas listas para comer y alimentos frescos preparados). El manual analítico bacteriológico (BAM) de la FDA (*Food and Drug Administration*) proporciona un protocolo diseñado para detectar los ooquistes de *Cryptosporidium* en lavados de productos frescos y en muestras filtrables como zumos (Ahmed y Karanis, 2018b).

La naturaleza de las diferentes matrices alimentarias (tamaño, consistencia, forma y superficie) dificulta su procesado para la detección e identificación de oquistes ya que se requieren muchos pasos previos (elución, concentración, purificación y aislamiento). Por ello, la necesidad de un método estándar, fiable y validado, que se adapte a las diferentes matrices alimentarias es esencial para asegurar la calidad de los análisis y establecer la vigilancia de la seguridad alimentaria.

## Conclusiones del Comité Científico

Se ha llevado a cabo una revisión de algunos peligros biológicos para los que no existe una regulación específica y que pueden suponer un riesgo emergente para la salud. La relación de peligros que se abordan en este informe no pretende ser exhaustiva, ya que no contempla todos los posibles peligros biológicos novedosos y su enfoque es el de servir de punto de partida para la posible realización de estudios prospectivos, razón por la cual se presta especial atención a señalar los alimentos que pueden ser de especial importancia en la transmisión de los peligros contemplados y describir las metodologías disponibles para su detección en muestras alimentarias.

Al mismo tiempo se identifican lagunas en el conocimiento de dichos peligros que pueden ser el punto de partida para promover actividades de investigación encaminadas a mejorar el conocimiento de los mismos.

Finalmente se ha incluido información sobre las posibilidades de control de la transmisión de los microorganismos a través de la cadena alimentaria, que puede servir para mejorar el conocimiento de los mismos entre los consumidores y otros sectores involucrados.

## Referencias

### Virus

- AESAN (2011). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre contaminación vírica de los alimentos, con especial énfasis en moluscos bivalvos, y métodos de control. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 14, pp: 89-105.
- Baert, L., Mattison, K., Loisy-Hamon, F., Harlow, J., Martyres, A., Lebeau, B., Stals, A., Van Coillie, E., Herman, L. y Uyttendaele, M. (2011). Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health? *International Journal of Food Microbiology*, 151 (3), pp: 261-269.
- Bosch, A., Pintó, R.M. y Guix, S. (2016). Foodborne viruses. *Current Opinion in Food Science*, 8, pp: 110-119.
- Bosch, A., Gkogka, E., Le Guyader, F.S., Loisy-Hamon, F., Lee, A., van Lieshout, L., Marthi, B., Myrmele, M., Sansom, A., Schultz, A.C., Winkler, A., Zuber, S. y Phister, T. (2018). Foodborne viruses: detection, risk assessment, and control options in food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 285, pp: 110-128.
- Callejón, R.M., Rodríguez-Naranjo, M.I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., García-Parrilla, M.C. y Troncoso, A.M. (2015). Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12 (1), pp: 32-38.
- Domanovic, D., Tedder, R., Blumel, J., Zaaijer, H., Gallian, P., Niederhauser, C., Saulede-Oliveras, S., O'Riordan, J., Boland, F., Harritshoj, L., Nascimento, M.S.J., Ciccaglione, A.R., Politis, C., Adlhoch, C., Flan, B., Oualikene-Gonin, W., Rautmann, G., Strengers, P. y Hewitt, P. (2017). Hepatitis E and blood donation safety in selected European countries: a shift to screening? *Euro Surveill*, 22: 30514.

- EFSA (2011). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal*, 9 (7): 20190, pp: 1-96.
- EFSA (2012). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. *EFSA Journal*, 10 (1): 2500, pp: 1-39.
- EFSA (2015). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Scientific opinion on the evaluation of heat treatments, different from those currently established in the EU legislation, that could be applied to live bivalve molluscs from B and C production areas, that have not been submitted to purification or relaying, in order to eliminate pathogenic microorganisms. *EFSA Journal*, 13 (12): 4332.
- EFSA (2016a). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Technical specifications for a European baseline survey of norovirus in oysters. *EFSA Journal*, 14 (3): 4414.
- EFSA (2016b). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14 (12): 4634.
- EFSA (2016c). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Summary Report of Joint Scientific Workshop on Foodborne Viruses. *EFSA Journal Supporting Publication*, 13 (10). Disponible en: <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1103> [acceso: 12-11-18].
- EFSA (2017a). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFSA Journal*, 15 (7): 4886, pp: 1-89.
- EFSA (2017b). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, (15): 5077.
- FAO (2012). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of Viruses in Food. CAC/GL 79-2012. Disponible en: [www.fao.org/input/download/standards/13215/CXG\\_079e.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/13215/CXG_079e.pdf) [acceso: 12-11-18].
- Havelaar, A.H., Galindo, A.V., Kurowicka, D. y Cooke, R.M. (2008). Attribution of foodborne pathogens using structured expert elicitation. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5 (5), pp: 649-659.
- ISO (2013). International Organization for Standardization. Norovirus and hepatitis A virus analyses from food and animal feed. ISO/TS15216-1. 2013.
- ISO (2017). International Organization for Standardization. Microbiology of the food chain - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR - Part 1: Method for quantification. ISO 15216-1:2017 I. 2017.
- Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazić, S., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K., Moloney, R., de Roda Husman, A.M., Kaupke, A., Legaki, E., D'Agostino, M., Cook, N., Rzezutka, A., Petrovic, T. y Vantarakis, A. (2012). Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food and Environmental Virology*, 4, pp: 179-191.
- Lopman, B.A., Steele, D., Kirkwood, C.D. y Parashar, U.D. (2016). The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control. *PLoS Medicine Journal*, 13: e1001999. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001999> [acceso: 12-11-18].
- Losio, M.N., Pavoni, E., Bilei, S., Bertasi, B., Bove, D., Capuano, F., Farneti, S., Blasi, G., Comin, D., Cardamone, C., Decastelli, L., Delibato, E., De Santis, P., Di Pasquale, S., Gattuso, A., Goffredo, E., Fadda, A., Pisanu, M. y De Medici, D. (2015). Microbiological survey of raw and ready-to-eat leafy green vegetables marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 210, pp: 88-91.
- Loutreul, J., Cazeaux, C., Levert, D., Nicolas, A., Vautier, S., Le Sauvage, A.L., Perelle, S. y Morin, T. (2014). Prevalence of human noroviruses in frozen marketed shellfish, red fruits and fresh vegetables. *Food and Environmental Virology*, 6, pp: 157-168.
- Mansuy, J.M., Saune, K., Rech, H., Abravanel, F., Mengelle, C.S.L.H., Destruel, F., Kamar, N. e Izopet, J. (2015). Seroprevalence in blood donors reveals widespread, multi-source exposure to hepatitis E virus, southern France, October 2011. *Euro Surveillance Journal*, 20, pp: 27-34.

- Mattison, K., Harlow, J., Morton, V., Cook, A., Pollari, F., Bidawid, S. y Farber, J.M. (2010). Enteric viruses in ready-to-eat packaged leafy greens. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 16, pp: 1815-1817.
- Mesquita, J.R., Oliveira, D., Rivadulla, E., Abreu-Silva, J., Varela, M.F., Romalde, J.L. y Nascimento, M.S. (2016). Hepatitis E virus genotype 3 in mussels (*Mytilus galloprovincialis*), Spain. *Food Microbiology*, 58, pp: 13-15.
- Navas, E., Torner, N., Broner, S., Godoy, P., Martínez, A., Bartolome, R. y Domínguez, A. (2015). Economic costs of outbreaks of acute viral gastroenteritis due to norovirus in Catalonia (Spain), 2010-2011. *BMC Public Health*, 15: 999.
- Romalde, J.L., Rivadulla, E., Varela, M.F. y Barja, J.L. (2017). An overview of 20 years of studies on the prevalence of human enteric viruses in shellfish from Galicia, Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 124 (4), pp: 943-957.
- Sabria, A., Pinto, R.M., Bosch, A., Bartolome, R., Cornejo, T., Torner, N., Martínez, A., de Simon, M., Domínguez, A. y Guix, S. (2014). Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant. *Journal of Clinical Virology*, 60, pp: 96-104.
- Terio, V., Bottaro, M., Pavoni, E., Losio, M.N., Serraino, A., Giacometti, F., Martella, V., Mottola, A., Di Pinto, A. y Tantiello, G. (2017). Occurrence of hepatitis A and E and norovirus GI and GII in ready-to-eat vegetables in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 249, pp: 61-65.
- UE (2012). Reglamento de Ejecución (UE) N° 1235/2012 de la Comisión de 19 de diciembre de 2012 que modifica el anexo I del Reglamento (CE) N° 669/2009 por el que se aplica el Reglamento (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la intensificación de los controles oficiales de las importaciones de determinados piensos y alimentos de origen no animal. DO L 350 de 20 de diciembre de 2012, pp: 44-50.

### **Yersinia**

- Adak, G.K., Long, S.M. y O'Brien, S.J. (2002). Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut*, 51, pp: 832-841.
- Bancerz-Kisiel, A. y Szveda, W. (2015). Yersiniosis - a zoonotic foodborne disease of relevance to public health. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22 (3), pp: 397-402.
- Batzilla, J., Heesemann, J. y Rakin, A. (2011). The pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* 1A. *International Journal of Medical Microbiology* 301 (7), pp: 556-561.
- Bonardi, S., Brindani, F., Pizzin, G., Lucidi, L., D'Incau, M., Liebana, E. y Morabito, S. (2003). Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 85 (1-2), pp: 101-110.
- Bonardi, S., Paris, A., Bacci, C., D'Incau, M., Ferroni, L. y Brindani, F. (2007). Detection and characterization of *Yersinia enterocolitica* from pigs and cattle. *Veterinary Research Communications*, 31 (1), pp: 347-350.
- Bonardi, S., Paris, A., Bassi, L., Salmi, F., Bacci, C., Riboldi, E., Boni, E., D'Incau, M., Tagliabue, S. y Brindani, F. (2010). Detection, semiquantitative enumeration, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in Pork and Chicken Meats in Italy. *Journal of Food Protection*, 73 (10), pp: 1785-1792.
- Bonardi, S., Bassi, L., Brindani, F., D'Incau, M., Barco, L., Carra, E. y Pongolini, S. (2013). Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 163 (2-3), pp: 248-257.
- Bonardi, S., Alpigiani, I., Pongolini, S., Morganti, M., Tagliabue, S., Bacci, C. y Brindani, F. (2014). Detection, enumeration and characterization of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in pig tonsils at slaughter in Northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 177, pp: 9-15.
- Bonardi, S., Bruini, I., D'Incau, M., Van Damme, I., Carniel, E., Brémont, S., Cavallini, P., Tagliabue, S. y Brindani, F. (2016). Detection, seroprevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in pig tonsils in Northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 235, pp: 125-132.
- CIBERESP (2017). Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2015.

- EFSA (2007). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Panel on Biological Hazards. Scientific Opinion on the monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. *EFSA Journal*, 595, pp: 1-30.
- EFSA (2009). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Technical specifications for harmonised national surveys of *Yersinia enterocolitica* in slaughter pigs. *EFSA Journal*, 7 (11): 1374, pp: 1-23.
- EFSA (2017) Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15 (12): 5077.
- Falcao, J.P., Falcão, D.P., Pitondo-Silva, A., Malaspina, A.C. y Brocchi, M. (2006). Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 55, pp: 1539-1548.
- Fosse, J., Seegers, H. y Magras, C. (2009). Prevalence and Risk Factors for Bacterial Food-Borne Zoonotic Hazards in Slaughter Pigs: A Review. *Zoonoses. Public Health*, 56, pp: 429-454.
- Fredriksson-Ahomaa, M. y Korkeala, H. (2003). Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clinical Microbiology Review*, 16 (2), pp: 220-229.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A. y Korkeala, H. (2006). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 47, pp: 315-329.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A. y Stephan, R. (2007). Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (3), pp: 207-212.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Gerhardt, M. y Stolle, A. (2009). High bacterial contamination of pig tonsils at slaughter. *Meat Science*, 83, pp: 334-336.
- Gnanasekaran, G., Na, E.J., Chung, H.Y., Kim, S., Kim, Y.-T., Kwak, W., Kim, H., Ryu, S., Choi, S.H. y Lee, J.-H. (2017). Genomic insights and its comparative analysis with *Yersinia enterocolitica* reveals the potential virulence determinants and further pathogenicity for foodborne outbreaks *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (2), pp: 262-270.
- Greenwood, M.H. y Hooper, W.L. (1990). Excretion of *Yersinia* spp. associated with consumption of pasteurized milk. *Epidemiology and Infection*, 104, pp: 345-350.
- Huovinen, E., Sihvonen, L.M., Virtanen, M.J., Haukka, K., Siitonen, A. y Kuusi, M. (2010). Symptoms and sources of *Yersinia enterocolitica*-infection: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 10: 122.
- ICMSF (1996). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganism in foods 5. En libro: *Characteristics of microbial pathogens*. Blackie Academic & Professional, London.
- ISO (2003). International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica* ISO 10273:2003.
- ISO (2017). International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica* ISO 10273:2017.
- Johannessen, G.S., Kapperud, G. y Kruse, H. (2000). Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Norwegian pork products determined by a PCR method and a traditional culturing method. *International Journal of Food Microbiology*, 54 (1-2), pp: 75-80.
- Lambertz, S.T., Granath, K., Fredriksson-Ahomaa, M., Johansson, K.E. y Danielsson-Tham, M.L. (2007). Evaluation of a combined culture and PCR method (NMKL-163A) for detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pork products. *Journal of Food Protection*, 70 (2), pp: 335-340.
- Lambertz, S.T., Nilsson, C., Hallanvuo, S. y Lindblad, M. (2008). Real-Time PCR Method for Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Food. *Applied Environmental Microbiology*, 74 (20), pp: 6060-6067.
- Laukanen-Ninios, R., Fredriksson-Ahomaa, M. y Korkeala, H. (2014). Enteropathogenic *Yersinia* in the Pork Production Chain: Challenges for Control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, pp: 1165-1191.
- Le Guern, A.S., Martin, L., Savin, C. y Carniel, E. (2016). Yersiniosis in France: Overview and potential sources of infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 46, pp: 1-7.

- Lorencova, A. y Slany, M. (2016). Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in minced meat, pig tongues and hearts at the retail level in the Czech Republic detected by real time PCR. *Potravinarstvo*, 10 (1), pp: 282-286.
- Marimon, J.M., Figueroa, R., Idigoras, P., Gomariz, M., Alkorta, M., Cilla, G. y Perez-Trallero, E. (2017). Thirty years of human infections caused by *Yersinia enterocolitica* in northern Spain: 1985-2014. *Epidemiology and Infection*, 145 (11), pp: 2197-2203.
- Messelhäusser, U., Kämpf, P., Colditz, J., Bauer, H., Schreiner, H., Höller, C. y Busch, U. (2011). Qualitative and quantitative detection of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in different food matrices at retail level in Bavaria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8 (1), pp: 39-44.
- Montville, T., Matthews, K. y Karel, K.E. (2012). *Food Microbiology*. En libro. Third edn, ASM Press, Washington.
- Nesbakken, T., Eckner, K., Høidal, H.K. y Røtterud, O.-J. (2003). Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering and dressing procedures. *International Journal of Food Microbiology*, 80, pp: 231-240.
- Nesbakken, T., Iversen, T., Eckner, K. y Lium, B. (2006). Testing of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig herds based on the natural dynamic of infection. *International Journal of Food Microbiology*, 111, pp: 99-104.
- Nielsen, B., Heisel, C. y Wingstrand, A. (1996). Time course of the serological response to *Yersinia enterocolitica* O:3 in experimentally infected pigs. *Veterinary Microbiology*, 48, pp: 293-303.
- Ortiz Martínez, P., Mylona, S., Drake, I., Fredriksson-Ahomaa, M., Korkeala, H. y Corry, J.E. (2010). Wide variety of bioserotypes of enteropathogenic *Yersinia* in tonsils of English pigs at slaughter. *International Journal of Food Microbiology*, 139, pp: 64-69.
- Ortiz Martínez, P., Fredriksson-Ahomaa, M., Palloti, A., Rosmini, R., Houf, K. y Korkeala, H. (2011). Variation in the prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in slaughter pigs from Belgium, Italy, and Spain. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, pp: 445-450.
- Painter, J.A., Hoekstra, R.M., Ayers, T., Tauxe, R.V., Braden, C.R., Angulo, F.J. y Griffin, P.M. (2013). Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19 (3), pp: 407-419.
- Petsios, S., Fredriksson-Ahomaa, M., Sakkas, H. y Papadopoulou, C. (2016). Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of *Yersinia enterocolitica* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 237, pp: 55-72.
- Rastawicki, W., Szych, J., Gierczyński, R. y Rokosz, N. (2009). A dramatic increase of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:8 infections in Poland. *European Journal of Clinical Microbiology on Infectious Diseases*, 28, pp: 535-537.
- Ratnam, S., Mercer, E., Picco, B., Parsons, S. y Butler, R. (1982). A nosocomial outbreak of diarrhoea disease due to *Yersinia enterocolitica* serotype O:5, biotype 1. *Journal Infection Diseases*, 145, pp: 242-247.
- Scallan, E., Griffi, P.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V. y Hoekstra, R.M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States - Unspecified Agents. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (1), pp: 7-15.
- Sabina, Y., Rahman, A., Ramesh, Ch.R. y Montet, D. (2011). *Yersinia enterocolitica*: Mode of Transmission, Molecular Insights of Virulence, and Pathogenesis of Infection. *Journal of Pathogens*. Article ID 429069.
- SIM (2017). Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe anual del Sistema de Información Microbiológica de 2016.
- Sihvonen, L.M., Hallanvuori, S., Haukka, K., Skurnik, M. y Siitonen, A. (2011). The ail gene is present in some *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, pp: 455-457.
- Tennant, S.M., Grant, T.H. y Robins-Browne, R.M. (2003). Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Microbiology Letters*, 38, pp: 127-137.
- Van Damme, L.V., Berkens, D., Vanantwerpen, G., Baré, J., Houf, K., Wauters, G. y De Zutter, L. (2015). Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with enteropathogenic. *International Journal of Food Microbiology*, 204, pp: 33-40.

- Vaillant, V., De Vaill, H., Baron, E., Ancelle, T., Colin, P., Delmas, M.-C., Dufour, B., Pouillot, R., Le Strat, Y., Weinbreck, P., Jougla, E. y Desenclos, J.C. (2005). Foodborne infections in France. *Foodborne Pathogens Diseases*, 2, pp: 221-232.
- Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, A. y Łaniewska-Trokenheim, L. (2014). *Yersinia enterocolitica*: A Dangerous, But Often Ignored, Foodborne Pathogen. *Food Reviews International*, 30, pp: 53-70.
- Zheng, H., Sun, Y., Mao, Z. y Jiang, B. (2008). Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53, pp: 368-374.

### **Vibrio**

- Arias, C.R., Macian, M.C., Aznar, R., Garay, E. y Pujalte, M.J. (1999). Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. *Journal of Applied Microbiology*, 86 (1), pp: 125-134.
- Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R. y Martinez-Urtaza, J. (2010). Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: A European perspective. *Environmental Microbiology Reports*, 2 (1), pp: 7-18.
- Baker-Austin, C., Trinanes, J.A., Taylor, N.G.H., Hartnell, R., Siitonen, A. y Martinez-Urtaza, J. (2013). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Climate Change*, 3 (1), pp: 73-77.
- Biosca, E.G., Amaro, C., Esteve, C., Alcaide, E. y Garay, E. (1991). First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases*, 14 (1), pp: 103-109.
- Burge, C.A., Eakin, C.M., Friedman, C.S., Froelich, B.A., Ford, S.E., Hershberger, P.K., Hofmann, E.E., Petes, L.E., Prager, K.C., Weil, E., Willis, B.L., Ford, S.E. y Harvell, C.D. (2014). Climate change influences on marine infectious diseases: Implications for management and society. *Annual Review of Marine Science*, 6, pp: 249-277.
- Campbell, M.S. y Wright, A.C. (2003). Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 69 (12), pp: 7137-7144.
- Cañigral, I., Moreno, Y., Alonso, J.L., González, A. y Ferrús, M.A. (2010). Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. *Microbiological Research*, 165 (8), pp: 657-664.
- DOG (2013). Diario Oficial de Galicia. Orden de 11 de diciembre por la que se regula el sistema básico de la Red gallega de vigilancia en salud pública. DOG nº 243 de 20 de diciembre de 2013.
- EFSA (2016). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14 (12): 4634.
- EFSA (2017). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15 (12): 5077.
- Elhadi, N., Radu, S., Chen, C.H. y Nishibuchi, M. (2004). Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia. *Journal of Food Protection*, 67, pp: 1469-1475.
- FAO/OMS (2005). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud. Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters: Interpretative Summary and Technical Report. Microbiological risk assessment series. Rome. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/008/a0252e/a0252e00.htm> [acceso: 11-12-18].
- Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Mukai, T. y Ueho, T. (1953). On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning. *Medical Journal of Osaka University*, 4, pp: 299-304.
- Guerrero, A., Gómez Gil Rodríguez, B., Wong-Chang, I. y Lizárraga-Partida, M.L. (2015). Genetic characterization of *Vibrio vulnificus* strains isolated from oyster samples in Mexico. *International Journal of Environmental Health Research*, 25 (6), pp. 614-627.
- Hara-Kudo, Y., Saito, S., Ohtsuka, K., Yamakasi, S., Yahiro, S., Nishio, T., Iwade, Y., Otomo, Y., Konuma, H., Tanaka, H., Nakagawa, H., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y. y Kumagai, S. (2012). Characteristics of a sharp decrease

- in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 157, pp: 95-101.
- Hill, W.E., Keasler, S.P., Trucksess, M.W., Feng, P., Kaysner, C.A. y Lampel, K.A. (1991). Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Applied and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology*, 57 (3), pp: 707-711.
- Honda, T., Takeda, Y., Miwatani, T., Kato, K. y Nimura, Y. (1976). Clinical features of patients suffering from food poisoning due to *Vibrio parahaemolyticus*, especially on changes in electrocardiograms. *Journal of the Japanese Association of Infectious Diseases*, 50, pp: 216-223.
- Honda, T., Ni, Y.X. y Miwatani, T. (1988). Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of a kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 56, pp: 961-965.
- Honda, T. e Iida, I. (1993). The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of thermostable direct hemolysin and related hemolysins. *Reviews in Medical Microbiology*, 4, pp: 106-113.
- Horseman, M.A. y Surani, S. (2011). A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *International journal of infectious diseases*, 15 (3), pp: e157-166.
- Janda, J.M., Newton, A.E. y Bopp, C.A. (2015). Vibriosis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35 (2), pp: 273-288.
- Jones, J.L., Lüdeke, C.H., Bowers, J., Garrett, N., Fischer, M., Parsons, M.B., Bopp, C.A. y De Paola, A. (2012). Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 00196e00112.
- Jones, M.K. y Oliver, J.D. (2009). *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infection and Immunity. American Society for Microbiology (ASM)*, 77 (5), pp: 1723-1733.
- Kaneko, T. y Colwell, R.R. (1975). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Applied Microbiology*, 30, pp: 251-257.
- Kawatsu, K., Ishibashi, M. y Tsukamoto, T. (2006). Development and evaluation of a rapid, simple and sensitive immunochromatographic assay to detect thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* in enrichment cultures of stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, pp: 1821-1827.
- Martínez-Rienda, M.I., Alkorta-Gurrutxaga, M., López-Soria, L., Hernández-Almaraz, J.L. y Elorriaga, L.F. (2007). Nota clínica. Infección por *Vibrio vulnificus* en las costas cantábricas. *Gaceta Médica Bilbao*, 104, pp: 27-29.
- Martínez-Urtaza, J., Powell, A., Jansa, J., Castro-Rey, J.L., Paz-Montero, O., García-Campello, M., Zamora-López, J., Pousa, A., Faraldo-Valles, M.J., Trinanés, J., Hervio-Health, D., Keay, W., Bayley, A., Hartnell, R. y Baker-Austin, C. (2016). Epidemiological investigation of a foodborne outbreak in Spain associated with U.S. West Coast genotypes of *Vibrio parahaemolyticus*. *Springerplus*, 5, pp: 87.
- Martínez-Urtaza, J., Trinanés, J., Abanto, M., Lozano-Leon, A., Llovo-Taboada, J., García-Campello, M., Pousa, A., Powell, A., Baker-Austin, C. y González-Escalona, N. (2018). Epidemic dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* illness in a hotspot of disease emergence, Galicia, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 24, pp: 852-859.
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibushi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Ramamurthy, T., Wong, H.C., Depaola, A., Kim, Y.B., Albert, M.J. y Nishibuchi, M. (2000). Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* emergence related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, pp: 578-585.
- Nelapati, S., Nelapati, K. y Chinam, B.K. (2012). *Vibrio parahaemolyticus*-An emerging foodborne pathogen-A review. *Veterinary World*, 5, pp: 48-62.
- Nemoto, J., Sugawara, C., Akahane, K., Hashimoto, K., Kojima, T., Ikedo, M., Konuma, H. y Hara-Kudo, Y. (2009). Rapid and specific detection of the thermostable direct hemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Food Protection*, 72, pp: 748-754.

- Nordstrom, J.L., Vickery, M.C., Blackstone, G.M., Murray, S.L. y De Paola, A. (2007). Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, pp: 5840-5847.
- Oliver, J.D. (2013). *Vibrio vulnificus*: Death on the half shell. A personal journey with the pathogen and its ecology. *Microbial Ecology*, 65, pp: 793-799.
- Oliver, J.D. (2015). The Biology of *Vibrio vulnificus*. *Microbiology Spectrum*. asm Pub2Web, 3 (3), pp. 1-10.
- Ortiz-Jiménez, M.A. (2018). Quantitative evaluation of the risk of *Vibrio parahaemolyticus* through consumption of raw oysters (*Crassostrea corteziensis*) in Tepic. Mexico, under the RCP2.6 and RCP8.5 climate scenarios at different time horizons. *Food Research International*, 111, pp: 111-119.
- Pavia, A.T., Bryan, J.A., Maher, K.L., Hester Jr., T.R. y Farmer, J.J. (1989). *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. *Annual International Medicine*, 3, pp: 85-86.
- Rippey, S.R. (1994). Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, pp: 419-425.
- Roux, F.Le., Wegner, K.M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C.R., Amaro, C., Ritchie, J.M., Defoirdt, T., Destoumieux-Garzón, D., Blokesch, M., Mazel, D., Jacq, A., Cava, F., Gram, L., Wendling, C.C., Strauch, E., Kirschner, A. y Huehn, S. (2015). The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Frontiers in Microbiology*, 6, pp: 830.
- Sakata, J., Yonekita, T. y Kawatsu, K. (2018). Development of a rapid immunochromatographic assay to detect contamination of raw oysters with enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 264, pp: 16-24.
- SCVMPH (2001). Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in raw and undercooked seafood). Disponible en: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com\\_scv\\_out45\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scv_out45_en.pdf). [acceso: 12-11-18].
- SIM (2016). Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2015.
- Strom, M.S. y Paranjpye, R.N. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*, 2 (2), pp: 177-188.
- Torres, L., Escobar, S., López, A.I., Marco, M.L. y Pobo, V. (2002). Wound Infection due to *Vibrio vulnificus* in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21 (7), pp: 537-538.
- UE (2005). Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO L 338 de 22 de diciembre de 2005, pp: 1-26.
- UNE-EN ISO (2018). International Organization for Standardization Norma Española Método horizontal para la detección de especies potencialmente enteropatógenas *Vibrio spp.* Parte 1 : Detección de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae*. UNE-EN ISO 21872-1:2017.
- Vezzulli, L., Colwell, R.R. y Pruzzo, C. (2013). Ocean warming and spread of pathogenic vibrios in the aquatic environment. *Microbial Ecology*, 65, pp: 817-825.
- Warner, E.B. y Oliver, J.D. (2008). Multiplex PCR Assay for Detection and Simultaneous Differentiation of Genotypes of *Vibrio vulnificus* Biotype 1". *Foodborne Pathogens and Disease*, 5 (5), pp: 691-693.
- Xie, T., Wu, Q., Zhang, J., Xu, X. y Cheng, J. (2017). Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from aquatic products and clinical by antibiotic susceptibility, virulence and molecular characterization. *Food Control*, 71, pp: 315-321.

### ***E. coli***

- Adak, G.K., Long, S.M. y O'Brien, S.J. (2002). Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut*, 51 (6), pp: 832-841.

- Afset, J.E., Bergh, K. y Bevanger, L. (2003). High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, 52 (11), pp: 1015-1019.
- Álvarez-Suárez, M.E., Otero, A., García-López, M.L., Dahbi, G., Blanco, M., Mora, A., Blanco, J. y Santos, J.A. (2016). Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *International Journal of Food Microbiology*, 236, pp:148-154.
- Anjum, M.F., Mafura, M., Slickers, P., Ballmer, K., Kuhnert, P., Woodward, M.J. y Ehricht, R. (2007). Pathotyping *Escherichia coli* by using miniaturized DNA microarrays. *Applied and environmental microbiology*, 73 (17), pp: 5692-5697.
- Bautista-De León, H., Gómez-Aldapa, C.A., Rangel-Vargas, E., Vázquez-Barrios, E. y Castro-Rosas, J. (2013). Frequency of indicator bacteria, *Salmonella* and diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes on ready-to-eat cooked vegetable salads from Mexican restaurants. *Letters in Applied Microbiology*, 56 (6), pp: 414-420.
- Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J. y Harel, J. (2003). Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *Journal of clinical microbiology*, 41 (5), pp: 2113-2125.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Alonso, M.P., Mora, A., Coira, M.A., Madrid, C., Juárez, A., Bernárdez, M. y Blanco, J. (2006). Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *International Microbiology*, 9 (2), pp: 103-110.
- Callejón, R.M., Rodríguez-Naranjo, M.I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M.C. y Troncoso, A.M. (2015). Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12 (1), pp: 32-38.
- Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J.F., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C.A. y Estrada-García, T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology*, 156 (2), pp: 176-180.
- Dallman, T.J., Chattaway, M.A., Cowley, L.A., Doumith, M., Tewolde, R., Wooldridge, D.J., Underwood, A., Ready, D., Wain, J., Foster, K., Grant, K.A. y Jenkins, C. (2014). An Investigation of the Diversity of Strains of Enteroggregative *Escherichia coli* Isolated from Cases Associated with a Large Multi-Pathogen Foodborne Outbreak in the UK A. Cloeckeaert, ed. *PLoS ONE*, 9 (5), p.e98103.
- EFSA (2013). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal*, 11 (4): 3138.
- EFSA (2015). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Public health risks associated with Enteroggregative *Escherichia coli* (EAEC) as a food-borne pathogen. *EFSA Journal*, 13 (12): 4330.
- EFSA (2017). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15 (12): 5077.
- Escher, M., Scavia, G., Morabito, S., Tozzoli, R., Maugliani, A., Cantoni, S., Fracchia, S., Bettati, A., Casa, R., Gesu, G.P., Torresani, E., y Caprioli, A. (2014). A severe foodborne outbreak of diarrhoea linked to a canteen in Italy caused by enteroinvasive *Escherichia coli*, an uncommon agent. *Epidemiology and Infection*, 142 (12), pp: 2559-2566.
- Espinosa, L., Varela, C., Martínez, E. y Cano, R. (2014). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2008-2011 (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal*, 22 (11), pp: 130-136.
- Ethelberg, S., Lisby, M., Böttiger, B., Schultz, A.C., Villif, A., Jensen, T., Olsen, K.E., Scheutz, F., Kjelsø, C. y Muller, L. (2010). Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *Eurosurveillance*, 15 (6), pp: 19484.
- Feng, P., Weagant, S.D. y Jinneman, K. (2017). Diarrheagenic *Escherichia coli*. In *Bacteriological Analytical Manual*. Center for Food Safety and Applied Nutrition.

- Hernandes, R.T., Elias, W.P., Vieira, M.A.M. y Gomes, T. (2009). An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 297 (2), pp: 137-149.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. y Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (2), pp: 123-140.
- Lindsey, R.L., Fedorka-Cray, P.J., Abley, M., Turpin, J.B. y Meinersmann, R.J. (2015). Evaluating the occurrence of *Escherichia albertii* in chicken carcass rinses by PCR, Vitek analysis, and sequencing of the *rpoB* gene. *Applied and environmental microbiology*, 81 (5), pp.1727-1734.
- MacDonald, E., Moller, K.E., Wester, A.L., Dahle, U.R., Hermansen, N.O., Jenum, P.A., Thoresen, L. y Vold, L. (2015). An outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection in Norway, 2012: A reminder to consider uncommon pathogens in outbreaks involving imported products. *Epidemiology and Infection*, 143 (3), pp: 486-493.
- Michelacci, V., Prosseda, G., Maugliani, A., Tozzoli, R., Sanchez, S., Herrera-León, S., Dallman, T., Jenkins, C., Caprioli, A. y Morabito, S. (2016). Characterization of an emergent clone of enteroinvasive *Escherichia coli* circulating in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 22 (3), pp: 287.e11-287.e19.
- Nataro, J.P. y Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11 (1), pp:142-201.
- Nimri, L.F. (2013). *Escherichia albertii*, a newly emerging enteric pathogen with poorly defined properties. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77 (2), pp: 91-95.
- Okeke, I.N. y Nataro, J.P. (2001). Enteroaggregative *Escherichia coli*. *The Lancet. Infectious diseases*, 1 (5), pp: 304-313.
- Painter, J.A., Hoekstra, R.M., Ayers, T., Tauxe, R.V., Braden, C.R., Angulo, F.J. y Griffin, P.M. (2013). Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities Using Outbreak Data, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19 (3), pp: 407-415.
- Pakalniskiene, J., Falkenhorst, G., Lisby, M., Madsen, S.B., Olsen, K., Nielsen, E.M., Mygh, A., Boel, J. y Mølbak, K. (2009). A foodborne outbreak of enterotoxigenic *E. coli* and *Salmonella anatum* infection after a high-school dinner in Denmark, November 2006. *Epidemiology and Infection*, 137 (3), pp: 396-401.
- Scavia, G., Escher, M., Baldinelli, F., Pecoraro, C. y Caprioli, A. (2009). Consumption of Unpasteurized Milk as a Risk Factor for Hemolytic Uremic Syndrome in Italian Children. *Clinical Infectious Diseases*, 48 (11), pp: 1637-1638.
- Skočková, A., Bogdanovičová, K., Koláčková, I. y Karpíšková, R. (2015). Antimicrobial-resistant and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in raw cow's milk. *Journal of Food Protection*, 78 (1), pp: 72-77.
- Spina, A., Kerr, K.G., Cormican, M., Barbut, F., Eigentler, A., Zerva, L., Tassios, P., Popescu, G.A., Rafila, A., Eerola, E., Batista, J., Maass, M., Aschbacher, R., Olsen, K.E.P. y Allerberger, F. (2015). Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*, 21 (8), pp: 719-728.
- Tozzoli, R. y Scheutz, F. (2014). Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections in humans. In S. Morabito. En libro: *Pathogenic Escherichia Coli, Molecular and Cellular Microbiology*. Norfolk, U.K.: Caister Academic Press, pp: 1-18.
- Trabulsi, L.R., Keller, R., Tardelli Gomes, T.A. y Gomes, T. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (5), pp: 508-513.
- UE (2005). Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO L 338 de 22 de diciembre de 2005, pp: 1-26.
- van Hoek, A., Veenman, C., van Overbeek, W.M., Lynch, G., de Roda Husman, A.M. y Blaak, H. (2015). Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 204, pp: 1-8.
- Yang, S.C., Lin, C.H., Aljuffali, I.A. y Fang, J.Y. (2017). Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Archives of Microbiology*, 199 (6), pp: 811-825.

**C. difficile**

- Alcalá-Hernández, L., Marín-Arriaza, M., Mena-Ribas, A. y Niubó-Bosh, J. (2015). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. En libro: *Procedimientos en Microbiología Clínica*, Vol. 34, pp: 595-602. Cercenado Mansilla & R. Cantón Moreno (Eds.).
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J.L., Peláez, T., Astorga, R.J., Harmanus, C., Kuijper, E. y García, M.E. (2013). High prevalence of the epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in Iberian free-range pigs. *Research in Veterinary Science*, 95 (2), pp: 358-361.
- Asensio, A., y Monge, D. (2012). Epidemiología de la infección por *Clostridium difficile* en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30 (6), pp: 333-337.
- Bartlett, J.G. (2008). Historical Perspectives on Studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 46 (s1), pp: S4-S11.
- Brown, A.W. y Wilson, R.B. (2018). *Clostridium difficile* colitis and zoonotic origins - a narrative review. *Gastroenterology Report*, 6 (3), pp: 157-166.
- Candel-Pérez, C., Ros-Berruazo, G. y Martínez-Graciá, C. (2018). A review of *Clostridioides [Clostridium] difficile* occurrence through the food chain. *Food Microbiology*, 77, pp: 118-129.
- Crobach, M.J., Vernon, J., Loo, V.G., Kong, L.Y., Péchiné, S., Wilcox, M.H. y Kuijper, E.J. (2018). Understanding *Clostridium difficile* colonization. *Clinical Microbiology Reviews*, 31 (2), pp: 1-29.
- Eckert, C., Burghoffer, B. y Barbut, F. (2013). Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile* in France. *Journal of Medical Microbiology*, 62, pp: 1435-1438.
- EFSA (2017). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15 (12): 5077.
- Fawley, W.N., Knetsch, C.W., MacCannell, D.R., Harmanus, C., Du, T., Mulvey, M.R., Paulick, A., Anderson, L., Kuijper, E.J. y Wilcox, M.H. (2015). Development and Validation of an Internationally-Standardized, High-Resolution Capillary Gel-Based Electrophoresis PCR-Ribotyping Protocol for *Clostridium difficile*. *Plos One*, 10 (2), e0118150.
- Freeman, J., Bauer, M.P., Baines, S.D., Corver, J., Fawley, W.N., Goorhuis, B., Kuijper, E.J. y Wilcox, M.H. (2010). The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 23 (3), pp: 529-549.
- González-García, N., Gómez-Pavón, J. y Martínez-Porras, J.L. (2005). Diagnóstico, tratamiento y control de la infección causada por *Clostridium difficile*. *Revista Española de Geriatría y Gerontología*, 40 (5), pp: 310-319.
- Knetsch, C.W., Lawley, T.D., Hensgens, M.P., Corver, J., Wilcox, M.W. y Kuijper, E.J. (2013). Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. *Eurosurveillance*, 18 (4), pp: 1-11.
- Knight, D.R., Putsathit, P., Elliott, B. y Riley, T.V. (2016). Contamination of Australian newborn calf carcasses at slaughter with *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*, 22 (3), pp: 266.e1-266.e7.
- Lawson, P.A., Citron, D.M., Tyrrell, K.L. y Finegold, S.M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 40, 95-99.
- Limbago, B., Thompson, A.D., Greene, S.A., MacCannell, D., MacGowan, C.E., Jolbitado, B., Hardin, H.D., Estes, S.R., Weese, J.S., Songer, J.G. y Gould, L.H. (2012). Development of a consensus method for culture of *Clostridium difficile* from meat and its use in a survey of U.S. retail meats. *Food Microbiology*, 32 (2), pp: 448-451.
- National Food Institute (2016). Technical University of Denmark. *Clostridium difficile* - A possible zoonotic link. Søborg, Denmark.
- Pasquale, V., Romano, V., Rupnik, M., Capuano, F., Bove, D., Aliberti, F., Krovacek, K. y Dumontet, S. (2012). Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscs. *Food Microbiology*, 31 (2), pp: 309-312.
- Rodríguez-Palacios, A., Borgmann, S., Kline, T.R. y LeJeune, J.T. (2013). *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure. *Animal Health Research Reviews*, 14 (1), pp: 11-29.

- Rodríguez-Pardo, D., Mirelis, B. y Navarro, F. (2013). Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31 (4), pp: 254-263.
- Rodríguez, C., Taminiau, B., Van Broeck, J., Delmée, M. y Daube, G. (2016). *Clostridium difficile* in Food and Animals: A Comprehensive Review. En libro: *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health: Volume 4*. G. Donelli (Ed.), Cham, Switzerland, pp: 65-92.
- Songer, J.G., Trinh, H.T., Killgore, G.E., Thompson, A.D., McDonald, L.C. y Limbago, B.M. (2009). *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 15 (5), pp: 819-821.
- Sorg, J.A. y Sonenshein, A.L. (2008). Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *Journal of Bacteriology*, 190 (7), pp: 2505-2512.
- Sugiyama, H., Mills, D.C. y Kuo, L. (1978). Number of *Clostridium botulinum* Spores in Honey. *Journal of Food Protection*, 41 (11), pp: 848-850.
- Voth, D.E. y Ballard, J.D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 18 (2), pp: 247-263.
- Warriner, K., Xu, C., Habash, M., Sultan, S. y Weese, S.J. (2017). Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: Significant sources of *C. difficile* community-acquired infection? *Journal of Applied Microbiology*, 122 (3), pp: 542-553.
- Weese, J.S., Avery, B.P., Rousseau, J. y Reid-Smith, R.J. (2009). Detection and enumeration of *Clostridium difficile* spores in retail beef and pork. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (15), pp: 5009-5011.

### **Toxoplasma**

- Belluco, S., Simonato, G., Mancin, M., Pietrobelli, M. y Ricci, A. (2017). *Toxoplasma gondii* infection and food consumption: A systematic review and meta-analysis of case-controlled studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 11, pp: 1-12.
- Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis in pigs - The last 20 years. *Veterinary Parasitology*. 164, pp: 89-103.
- EFSA (2017). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15: 5077.
- Eurostat (2016). Agriculture, forestry and fishery statistics. 2016 Edition. Theme: agriculture and fisheries collection: statistical books. Table 4.4, 103 pp. Disponible en: <http://ec.europa.eu/eurostat/documents/3217494/7777899/KS-FK-16-001-EN-N.pdf/cae3c56f-53e2-404a-9e9e-fb5f57ab49e3> [acceso: 12-11-18].
- OMS (2015). Organización Mundial de la Salud. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Disponible en: [https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne\\_disease/fergreport/en/](https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/) [acceso: 12-11-18].
- Opsteegh, M., Maas, M., Schares, G. and Giessena, J. (2016). Relationship between seroprevalence in the main livestock species and presence of *Toxoplasma gondii* in meat (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01) an extensive literature review. Final report.; EFSA External Scientific Report. 13 (2): EN-996, 294 pp. Disponible en: <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.en-996> [acceso: 12-11-18].
- Papini, R., di Ciccio, P., Marangi, M., Ghidini, S., Zanardi, E., Vergara, A., Giangaspero, A., Nardoni, S., Rocchigiani, G., Mancianti, F. y Ianieri, A. (2017). Occurrence of *Toxoplasma gondii* in Carcasses of Pigs Reared in Intensive Systems in Northern Italy. *Journal of Food Protection*, 80 (3), pp: 515-522.
- Rostami, A., Karanis, P. y Fallahi, S. (2018). Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Infection*, 46 (3), pp: 303-315.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L. y Griffin, P.M.. (2011). Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (1), pp: 7-15.
- UE (2003). Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre de 2003 sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo. DO L 325 de 12 de diciembre de 2003, pp: 31-40.

### ***Cryptosporidium***

- Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, R.S., Schoch, C.L., Smirnov, A. y Spiegel, F.W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59 (5), pp: 429-493.
- Ahmed, S.A. y Karanis, P. (2018a). Comparison of current methods used to detect *Cryptosporidium* oocysts in stools. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221 (5), pp: 743-763.
- Ahmed, S.A. y Karanis, P. (2018b). An overview of methods/techniques for the detection of *Cryptosporidium* in food samples. *Parasitology Research*, 117 (3), pp: 629-653.
- Bhalchandra, S., Cardenas, D. y Ward, H.D. (2018). Recent Breakthroughs and Ongoing Limitations in *Cryptosporidium* Research. *F1000 Research*. Disponible en: <https://f1000research.com/articles/7-1380/v1> [acceso: 12-11-18].
- Chang'a, J.S., Robertson, L.J., Mtambo, M.M., Mdegela, R.H., Løken, T. y Reksen, O. (2011). Unexpected results from large-scale cryptosporidiosis screening study in calves in Tanzania. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 105 (7), pp: 513-519.
- Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Sterling, C.R. y DuPont, H.L. (1996). *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. *The Journal of Infectious Diseases*, 173 (1), pp: 232-236.
- Dawson, D. (2005). Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology*, 103, pp: 207-227.
- Deng, M.Q. y Cliver, D.O. (1999). *Cryptosporidium parvum* studies with dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 46 (2), pp: 113-121.
- Deng, M.Q. y Cliver, D.O. (2001). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cider by flash pasteurization. *Journal of Food Protection*, 64 (4), pp: 523-552.
- ECDC (2018). European Centre for Disease Prevention and Control. Cryptosporidiosis. ECDC Annual epidemiological report for 2015. Stockholm.
- El Zawawy, L.A., El-Said, D., Ali, S.M. y Fathy, F.M. (2010). Disinfection efficacy of sodium dichloroiso- cyanurate (NADCC) against common food-borne intestinal protozoa. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 40 (1), pp: 165-185.
- Erickson, M.C. y Ortega, Y.R. (2006). Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. *Journal of Food Protection*, 69 (11), pp: 2786-2808.
- Fayer, R. (2008). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. En libro: *Biology*. Fayer R, Xiao L (eds), 2nd ed. CRC Press/IWA Publishing, Boca Raton, FL, pp: 1-42.
- Friedman, D.E, Patten, K.A., Rose, J.B. y Barney, M.C. (1997). The potential for *Cryptosporidium parvum* oocyst survival in beverages associated with contaminated tap water. *Journal of Food Safety*, 17, pp: 125-132.
- Goodgame, R.W., Genta, R.M., White, A.C. y Chappell, C.L. (1993). Intensity of infection in AIDS- associated cryptosporidiosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 167, pp: 704-709.
- Hanes, D.E., Worobo, R.W., Orlandi, P.A., Burr, D.H., Miliotis, M.D., Robl, M.G., Bier, J.W., Arrowood, M.J., Churey, J.J. y Jackson, G.J. (2002). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in fresh apple cider by UV irradiation. *Applied Environmental Microbiology*, 68 (8), pp: 4168-4172.
- Harp, J.A., Fayer, R., Pesch, B.A. y Jackson, G.J. (1996). Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Applied Environmental Microbiology*, 62 (8), pp: 2866-2868.
- Hunter, P.R., Hughes, S., Woodhouse, S., Raj, N., Syed, Q., Chalmers, R.M., Verlander, N.Q. y Goodacre, J. (2004). Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *Clinical Infectious Diseases*, 39, pp: 504-510.
- ISO (2016). International Organization for Standardization. Microbiología de la cadena alimentaria - Detección y recuento de *Cryptosporidium* y *Giardia* en vegetales de hoja verde y bayas ISO 18744:2016.

- Jenkins, M.B., Eaglesham, B.S., Anthony, L.C., Kachlany, S.C., Bowman, D.D. y Ghiorse, W.C. (2010). Significance of wall structure, macromolecular composition, and surface polymers to the survival and transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied Environmental Microbiology*, 76 (6), pp: 1926-1934.
- Johnston, S.P., Ballard, M.M., Beach, M.J., Causer, L. y Wilkins, P.P. (2003). Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, pp: 623-626.
- Kalisvaart, B.F. (2004). Re-use of wastewater: preventing the recovery of pathogens by using medium-pressure UV lamp technology. *Water Science & Technology*, 50 (6), pp: 337-344.
- Kniel, K.E., Sumner, S.S., Lindsay, D.S., Hackney, C.R., Pierson, M.D., Zajac, A.M., Golden, D.A. y Fayer, R. (2003). Effect of organic acids and hydrogen peroxide on *Cryptosporidium parvum* viability in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 66 (9), pp: 1650-1657.
- Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F., Faruque, A.S., Zaidi, A.K., Saha, D., Alonso, P.L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ochieng, J.B., Omere, R., Oundo, J.O., Hossain, A., Das, S.K., Ahmed, S., Qureshi, S., Quadri, F., Adegbola, R.A., Antonio, M., Hossain, M.J., Akinsola, A., Mandomando, I., Nhampossa, T., Acácio, S., Biswas, K., O'Reilly, C.E., Mintz, E.D., Berkeley, L.Y., Muhsen, K., Sommerfelt, H., Robins-Browne, R.M. y Levine, M.M. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, 382 (9888), pp: 209-222.
- Lonigro, A., Pollice, A., Spinelli, R., Berrilli, F., Di Cave, D., D'Orazi, C., Cavallo, P. y Brandonisio, O. (2006). *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in membrane-filtered municipal wastewater used for irrigation. *Applied Environmental Microbiology*, 72 (12), pp: 7916-7918.
- Mosier, D.A. y Oberst, R.D. (2000). Cryptosporidiosis. A global challenge. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916, pp: 102-111.
- Orta de Velásquez, M.T., Rojas-Valencia, M.N. y Reales-Pineda, A.C. (2006). Evaluation of phytotoxic elements, trace elements and nutrients in a standardized crop plant, irrigated with raw wastewater treated by APT and ozone. *Water Science & Technology*, 54 (11-12), pp: 165-173.
- Ortega, Y.R., Mann, A., Torres, M.P. y Cama, V. (2008). Efficacy of gaseous chlorine dioxide as a sanitizer against *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, and *Encephalitozoon intestinalis* on produce. *Journal of Food Protection*, 71 (12), pp: 2410-2414.
- Ortega, Y.R., Torres, M.P. y Tatum, J.M. (2011). Efficacy of levulinic acid-sodium dodecyl sulfate against *Encephalitozoon intestinalis*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Food Protection*, 74 (1), pp: 140-144.
- Robertson, L.J., Forberg, T., Hermansen, L., Gjerde, B.K., Alvsvåg, J.O. y Langeland, N. (2006). *Cryptosporidium parvum* infections in Bergen, Norway, during an extensive outbreak of water-borne giardiasis in autumn and winter 2004. *Applied Environmental Microbiology*, 72 (3), pp: 2218-2220.
- Savioli, L., Smith, H. y Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology*, 22 (5), pp: 203-208.
- Shirley, D.A., Moonah, S.N. y Kotloff, K.L. (2012). Burden of disease from cryptosporidiosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 25 (5), pp: 555-563.
- Slifko, T.R., Raghubeer, E. y Rose, J.B. (2000). Effect of high hydrostatic pressure on *Cryptosporidium parvum* infectivity. *Journal of Food Protection*, 63 (9), pp: 1262-1267.
- Stensvold, C.R., Lebbad, M. y Verweij, J.J. (2011). The impact of genetic diversity in protozoa on molecular diagnostics. *Trends in Parasitology*, 27 (2), pp: 53-58.
- Sutthikornchai, C., Jantanavivat, C., Thongrunkiat, S., Harnroongroj, T. y Sukthana, Y. (2005). Protozoal contamination of water used in Thai frozen food industry. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health*, 36 (Suppl 4), pp: 41-45.

- Teunis, P.F., Chappell, C.L. y Okhuysen, P.C. (2002a). *Cryptosporidium* dose response studies: variation between isolates. *Risk Analysis*, 22, pp: 175-183.
- Teunis, P.F., Chappell, C.L. y Okhuysen, P.C. (2002b). *Cryptosporidium* dose-response studies: variation between hosts. *Risk Analysis*, 22, pp: 475-485.
- Zhao, T., Zhao, P. y Doyle, M.P. (2009). Inactivation of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and poultry skin by combinations of levulinic acid and sodium dodecyl sulfate. *Journal of Food Protection*, 72 (5), pp: 928-936.



# Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la prospección de peligros químicos de interés en seguridad alimentaria en España

## Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Montaña Cámara Hurtado, María Pilar Conchello Moreno, Álvaro Daschner, Ramón Estruch Riba, Rosa María Giner Pons, María Elena González Fandos, Susana Guix Arnau, Ángeles Jos Gallego, Jordi Mañes Vinuesa, Olga Martín Beloso, María Aránzazu Martínez Caballero, José Alfredo Martínez Hernández, Alfredo Palop Gómez, David Rodríguez Lázaro, Gaspar Ros Berruezo, Carmen Rubio Armendáriz, María José Ruiz Leal, Jesús Ángel Santos Buelga, Pau Talens Oliag, Josep Antoni Tur Marí

## Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2018-005

Documento aprobado por la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico en su sesión plenaria de 28 de noviembre de 2018

## Grupo de trabajo

Ángeles Jos Gallego (Coordinadora)

Pilar Conchello Moreno

Olga Martín Beloso

María José Ruiz Leal

Giorgiana M. Catunescu (Colaboradora externa)

## Resumen

A lo largo de la cadena alimentaria pueden estar presentes, incorporarse o producirse distintos peligros de tipo químico que podrían suponer un riesgo para el consumidor.

El Comité Científico ha realizado una revisión de los peligros químicos de mayor interés para la seguridad alimentaria en España que no cuentan con una regulación específica, identificándolos y señalando aquellos alimentos o condiciones que, a priori, podrían implicar un mayor riesgo para el consumidor, con el fin de realizar, eventualmente, estudios prospectivos.

En el informe se han contemplado los siguientes peligros químicos y matrices: Cilindrospormop-sina (toxina de cianobacterias) en agua de bebida (no envasada), Cloropropanoles y Glicidol en alimentos infantiles, Furano y derivados en alimentos procesados en general y alimentos infantiles en particular, Hidrocarburos de aceites minerales, Micotoxinas producidas por hongos del género *Claviceps* en cereales y alimentos derivados, Toxinas de *Alternaria* en frutas, hortalizas, cereales y tomate, Micotoxinas de *Fusarium* (Eniáticas, Nivalenol) en cereales y Alcaloides de la pirrolizidina en alimentos infantiles, complementos alimenticios, miel, polen, té, infusiones y cereales.

De cada uno de ellos se describe su identificación y caracterización, la evaluación de la exposición, y se incluyen así mismo recomendaciones y consideraciones futuras.

Por otro lado, la identificación de nuevos peligros para los que puede producirse una exposición significativa, o la evaluación del riesgo derivado de una exposición o susceptibilidad nuevas o incrementadas significativamente a un peligro conocido es importante, no solo a efectos de un eventual control de estos peligros emergentes, sino también de promover la investigación y mejorar su conocimiento por parte de los consumidores y de la comunidad científica.

## Palabras clave

Cilindropermopsina, Cloropropanol, Furano, Hidrocarburos de aceites minerales, Micotoxinas de *Claviceps*, *Alternaria* y *Fusarium*, Alcaloides de la pirrolizidina.

## Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the prospection of chemical and biological hazards of interest in food safety in Spain

### Abstract

Along the food chain different chemical hazards may be present, incorporated or produced that could pose a risk to the consumer.

The Scientific Committee has reviewed the chemical hazards of most concern for food safety in Spain that are not specifically regulated, identifying them and drawing attention to those foods or conditions which, a priori, may involve a greater risk to consumers, with the purpose of eventually carrying out prospective studies.

The following chemical hazards and matrices have been considered in the report: Cylinderpermopsin (cyanobacteria toxin) in drinking water (not bottled), Chloropropanols and Glycidol in baby food, Furan and derivatives in processed foods in general, and particularly in baby food, Hydrocarbons of mineral oils, Mycotoxins produced by fungi of the *Claviceps* genus in cereals and derived foods, *Alternaria* toxins in fruits, vegetables, cereals and tomatoes, *Fusarium* mycotoxins (Enniatins, Nivalenol) in cereals and Pyrrolizidine alkaloids in baby food, food supplements, honey, pollen, tea, infusions and cereals.

The identification, characterisation, and exposure assessment of each are described, and recommendations and future considerations are also included.

Furthermore, the identification of new hazards which may have a significant exposure, or the risk assessment derived from a new or substantially increased exposure or susceptibility to a known hazard is important in order to not only eventually control these emerging hazards, but to also promote research and improve the knowledge of both consumers and the scientific community.

### Key words

Cylinderpermopsin, Chloropropanol, Furan, Hydrocarbons of mineral oils, *Claviceps*, *Alternaria* and *Fusarium* Mycotoxins, Pyrrolizidine alkaloids.

## 1. Introducción

A lo largo de la cadena alimentaria pueden estar presentes, incorporarse o producirse distintos peligros de tipo químico o biológico que pueden suponer un riesgo para el consumidor.

Los programas de control oficial tratan de garantizar la realización de controles de los peligros de interés en seguridad alimentaria en función del riesgo pero sólo afectan a aquellos parámetros con límites máximos fijados en determinados alimentos.

Sin embargo, existen otros peligros de interés en seguridad alimentaria para los que no existe una regulación específica, o existe pero sólo en determinados alimentos, que pueden ser objeto de programas de prospección con el fin de obtener datos que, además de proteger al consumidor de una exposición puntual a un peligro, permitan realizar una evaluación del riesgo.

Por otro lado, la identificación de nuevos peligros para los que puede producirse una exposición significativa, o la evaluación del riesgo derivado de una exposición o susceptibilidad nuevas o incrementadas significativamente a un peligro conocido es importante, no solo a efectos de un eventual control de estos peligros emergentes, sino también de promover la investigación y mejorar su conocimiento por parte de los consumidores y de la comunidad científica.

Por ello, se ha solicitado a la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) que realice una revisión de los peligros de mayor interés en seguridad alimentaria en España que no cuenten con una regulación específica, identificándolos y señalando aquellos alimentos o condiciones que, a priori, podrían implicar un mayor riesgo para el consumidor con el fin de realizar, eventualmente, estudios prospectivos.

## 2. Peligros químicos

Se han contemplado los siguientes peligros químicos y matrices:

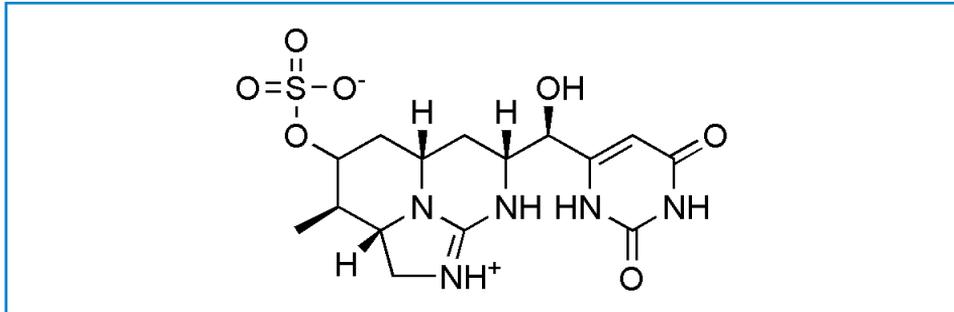
- Cilindropermopsina (toxina de cianobacterias) en agua de bebida (no envasada).
- Cloropropanoles y Glicidol en alimentos infantiles.
- Furano y derivados en alimentos procesados en general y alimentos infantiles en particular.
- Hidrocarburos de aceites minerales en todas las matrices.
- Micotoxinas producidas por hongos del género *Claviceps* en cereales y alimentos derivados.
- Toxinas de *Alternaria* en frutas, hortalizas, cereales y tomate.
- Micotoxinas de *Fusarium* (Eniatinas, Nivalenol) en cereales.
- Alcaloides de la pirrolizidina en alimentos infantiles, complementos alimenticios, miel, polen, té, infusiones y cereales.

### 2.1 Cilindropermopsina

#### 2.1.1 Identificación y caracterización del peligro

La cilindropermopsina (CYN) es una toxina producida por distintas especies de cianobacterias, entre ellas *Cylindropermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon* (actualmente *Chroococcoides*) *ovalisporum*, *Anabaena lapponica*, *Aphanizomenon flos-aquae* o *Raphidiopsis curvata* (Buratti et al., 2017). Se trata de un alcaloide tricíclico derivado de la guanidina unido a un grupo hidroximetiluracilo

(Ohtani et al., 1992), con un peso molecular de 415 Daltons y una elevada solubilidad en agua (Figura 1). También se han identificado variantes estructurales como la 7-epi-CYN y la 7-deoxi-CYN (Norris et al., 1999) (Banker et al., 2000).



**Figura 1.** Estructura química de la CYN

Con respecto a su toxicidad, el hígado y el riñón son los principales órganos diana de su toxicidad aguda, aunque también produce efectos en otros órganos (Terao et al., 1994) (Falconer et al., 1999) (Seawright et al., 1999).

Presenta distintos mecanismos de acción tóxica. Así, la CYN es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas lo que conduce a citotoxicidad (Terao et al., 1994) (Frosocio et al., 2003). Además, también inhibe la síntesis de glutatión (Runnegar et al., 1995), induce la producción de especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo y muerte celular por apoptosis (Buratti et al., 2017). Su toxificación por acción del citocromo P450 parece que tiene un papel importante en su toxicidad (Norris et al., 2002) y es considerada una sustancia pro-genotóxica (Zegura et al., 2011), no estando aún clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC).

El principal accidente de toxicidad humana asociado con CYN tuvo lugar en Palm Island (Queensland, Australia) en 1979 donde más de 100 niños de familias aborígenes tuvieron que ser hospitalizados con síntomas de hepatoenteritis (Byth, 1980). El accidente tuvo lugar tras aplicar sulfato de cobre para eliminar una floración de *C. raciborskii* en el único depósito de agua potable de la isla. Una de las razones esgrimidas para explicar la escasez de episodios tóxicos por floraciones de cianobacterias en humanos es la dificultad para establecer una relación causal cuando los síntomas son subclínicos (Buratti et al., 2017).

En la literatura científica existen diversos estudios sobre la toxicidad de CYN principalmente *in vitro* (Pichardo et al., 2017) pero también *in vivo*, en modelos experimentales de mamíferos (por ejemplo, Terao et al. (1994), de Almeida et al. (2013)) y peces (por ejemplo, Gutiérrez-Praena et al. (2012), Guzmán-Guillén et al. (2015)).

La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de la CYN pura en ratón por vía intraperitoneal depende del tiempo de observación siendo 2,1 mg/kg p.c. tras 24 horas, y 0,2 mg/kg p.c. a las 120-144 horas (Ohtani et al., 1992). Por vía oral, la DL<sub>50</sub> fue de 4,4-6,9 mg CYN equivalentes/kg p.c. tras 2-6 días (Seawright et al., 1999). Humpage y Falconer (2003) expusieron a ratones a un extracto de cianobacterias

conteniendo CYN tanto a través del agua de bebida durante 10 semanas como por sonda gástrica durante 11 semanas y establecieron como dato de nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) 30 µg/kg p.c./día, del que derivaron una ingesta diaria tolerable (IDT) de 0,03 µg/kg p.c./día y un valor guía en agua de 1 µg/l. No obstante, en la actualidad no existen límites legislados de CYN en agua en España.

### 2.1.2 Evaluación de la exposición

Se han detectado cianobacterias productoras de CYN en todos los continentes. En Europa, entre otras, *Chrysochloris ovalisporum* en España, *Anabaena laponica* en Finlandia, *Aphanizomenon flos-aque* en Alemania, *A. gracile* en Alemania y Polonia, *Anabaena planctonica* en Portugal y Francia, etc. La variedad de productores indica que esa producción no es específica de especie y que la lista de especies productoras puede seguir incompleta (Kokocinski et al., 2017). *Aphanizomenon gracile* y *A. flos-aquae* son las especies productoras de CYN más importantes en Europa (Cires y Ballot, 2016).

En cuanto a los niveles de CYN, el dato más alto del que se tiene constancia en el medio ambiente es 173 µg/l en un lago árido de Arabia Saudí (Mohamed y Al-Shehri, 2013). Rzymiski y Poniedziątek (2014) recogen una tabla con niveles máximos de CYN en aguas superficiales en distintos países, por ejemplo 12,1 µg/l en Alemania, 126 µg/l en Italia, 9,4 µg/l en España (Quesada et al., 2006), etc., superiores al valor propuesto por Humpage y Falconer (2003) de 1 µg/l. No obstante, generalmente se ha documentado la presencia de CYN en bajas concentraciones en el agua de bebida (Buratti et al., 2017). Dada su presencia en agua, la CYN también puede estar presente en alimentos como pescados, plantas y complementos alimenticios, aunque los datos al respecto son escasos (Buratti et al., 2017).

La exposición humana a CYN puede tener lugar principalmente por vía dérmica a través del baño y actividades recreativas en agua contaminada, y por vía oral al ingerir agua y alimentos contaminados o tragar agua durante actividades acuáticas.

Existen distintas técnicas analíticas que permiten detectar y/o cuantificar CYN en distintas matrices (agua, alimentos), tales como el ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), la cromatografía líquida con detector de ultravioleta (LC-UV) o la cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), considerándose ésta como la de elección. Hay disponibles protocolos publicados para su identificación y cuantificación (Guzmán-Guillén et al., 2012) (Triantis et al., 2017), existiendo además estándares comerciales aunque no materiales de referencia certificados.

### 2.1.3 Consideraciones futuras

Se espera una mayor incidencia de floraciones de cianobacterias (productoras o no de cianotoxinas) tanto en número como en distribución por distintos motivos, tales como su plasticidad genotípica, el cambio climático y la eutrofización de las aguas. De hecho, CYN fue identificada en aguas superficiales por primera vez en el año 2000 en Alemania, en 2004 en España e Italia, en 2006 en Francia, etc. (Rzymiski y Poniedziątek, 2014) indicativo de la naturaleza emergente de este tipo de peligro.

Actualmente la CYN no es un parámetro a controlar según el Real Decreto 140/2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (BOE, 2003), que sí incluye a otra cianotoxina, la microcistina con un valor de 1 µg/l (el mismo propuesto por Humpage y Falconer (2003) para CYN). La determinación de la misma sólo es preceptiva realizarla cuando exista sospecha de eutrofización en el agua de la captación, a la salida de la estación de tratamiento de agua potable o depósito de cabecera.

Recientemente, Testai et al. (2016) publicaron un informe científico externo para la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en relación al análisis de la presencia, exposición y toxicidad de las toxinas de cianobacterias en alimentos. Con respecto a la CYN se indica que son necesarios más datos toxicológicos, principalmente en lo que concierne a su genotoxicidad, a partir de los que se puedan derivar valores guía en salud. La bibliografía científica también establece la necesidad de monitorizar de forma sistemática la presencia de CYN en los embalses.

## 2.2 Cloropropanoles y Glicidol

Los cloropropanoles integran un grupo de contaminantes químicos derivados del glicerol que se forman durante el procesado y elaboración de determinados alimentos e ingredientes.

Estructuralmente los cloropropanoles están formados por una cadena de tres átomos de carbono, átomos de cloro y grupos alcohol. Los cloropropanoles que se encuentran habitualmente en los alimentos se distinguen entre sí por el número de átomos de cloro, de grupos hidroxilo y de su posición en la molécula: 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD), 2-monocloropropano-1,3-diol (2-MCPD), 1,3-dicloropropanol (1,3-DCP), 2,3-dicloropropanol (2,3-DCP), y 3-cloropropan-1-ol. El 3-MCPD es el contaminante más común del grupo de los cloropropanoles en los alimentos, seguido de 2-MCPD mientras que el compuesto 2,3-DCP se encuentra generalmente en los alimentos en concentraciones mucho más bajas que el 1,3-DCP y 3-cloropropan-1-ol.

Se conocen diferentes rutas de formación en los alimentos:

### a. Hidrólisis ácida de proteínas vegetales (PVH-ácido)

El 3-MCPD se detectó por primera vez en proteína vegetal hidrolizada mediante hidrólisis ácida (PVH-ácido) que es un ingrediente muy utilizado como acentuador del aroma en productos alimenticios procesados (Velíšek et al., 1978). En este proceso las proteínas (proteínas de maíz, trigo, caseína, levadura y arroz) son sometidas a un proceso de hidrólisis con ácido hidrocórico (a una temperatura entre 70 y 135 °C), el cual reacciona también con triglicéridos, fosfolípidos y glicerol presentes en la materia prima, dando lugar a la formación de cloropropanoles. Igualmente se encuentran en salsa de soja y condimentos afines, cuyo proceso de fabricación incluye el tratamiento del grano de soja con ácido hidrocórico. En este mecanismo, se propone la formación de un epóxido (glicidol) como producto intermedio de reacción.

### b. Procesado térmico de los alimentos

Posteriormente los cloropropanoles se han detectado también en cantidades más pequeñas en otros alimentos que no son sometidos a hidrólisis ácida durante la fabricación, como productos a

base de cereales y de panadería, carnes procesadas, pescado ahumado, cerveza y café (Crews et al., 2002). Se ha demostrado que se puede formar 3-MCPD cuando se someten alimentos que contienen lípidos y cloruro de sodio a una elevada temperatura, tales como los productos de pan y bollería (JECFA, 2006). También el cocinado/asado a la parrilla (tratamiento a alta temperatura) puede dar lugar a alguna formación de 3-MCPD en los alimentos. Hamlet et al. (2004a) proponen la formación de 3-MCPD cuando el glicerol reacciona con el cloruro sódico en presencia de otros ácidos, tales como ácido cítrico y acético, a temperatura elevada. Asimismo, se ha sugerido que el uso de la sucralosa en productos horneados puede conducir a la formación de cloropropanoles mediante la pirólisis del edulcorante sintético sucralosa, un compuesto policlorado, en presencia de glicerol (Rahn y Yaylayan, 2010). En alimentos procesados térmicamente, la formación y estabilidad del 3-MCPD depende del pH y temperatura a la que se expone el alimento, de hecho se ha comprobado que aditivos como el bicarbonato de sodio pueden inhibir su formación o acelerar su degradación (IFST, 2011).

#### c. Migración de materiales en contacto con los alimentos

Existe otra vía de contaminación alimentaria documentada por migración de 3-MCPD de resinas de poliamida-epiclorhidrina resistentes a la humedad presentes en cubiertas de papel y celulosa de uso alimentario (Pace y Hartman, 2010). No obstante, el desarrollo y utilización de resinas con niveles más bajos de 3-MCPD hace suponer que la exposición al 3-MCPD a partir de esta fuente seguirá disminuyendo.

#### d. Hidrólisis de ésteres de ácidos grasos de 3-MCPD

Por otra parte, diversos estudios describen una nueva fuente de 3-MCPD a partir de los ésteres del 3-MCPD (3-MCPDE) presentes en diversos productos alimenticios, puesto que de ellos se puede liberar 3-MCPD *in vivo* por la reacción de hidrólisis catalizada por la enzima lipasa. Estos estudios sugieren que las exposiciones al 3-MCPD liberado de sus ésteres son significativamente superiores a las observadas por el 3-MCPD en forma libre. Actualmente se acepta la hipótesis de un equivalente biodisponibilidad de 3-MCPD en forma libre y en forma de éster (EFSA, 2013).

Al igual que el 3-MCPD, sus ésteres se producen en los alimentos procesados a altas temperaturas, que tienen bajo contenido en agua, altos niveles de cloruro sódico y se almacenan durante largos períodos (FAO, 2007). Hamlet et al. (2004b) encontraron este tipo de ésteres en cereales procesados y mostraron que podían ser generados como intermedios estables o como productos de formación a partir de mono y diacilglicerol. Asimismo, diversos estudios han puesto de manifiesto la presencia de niveles significativos de ésteres de 3-MCPD en los aceites y grasas comestibles refinados y productos elaborados con ellos (BfR, 2007) (FSA, 2009) (EFSA, 2016). Estos se forman por reacción de los ácidos grasos libres presentes en los aceites y grasas con 2- y 3-MCPD. Dependiendo del ácido graso se pueden formar 14 monoésteres y 49 diésteres diferentes de 3-MCPD.

Por otra parte, el glicidol es un compuesto orgánico formado por un anillo epóxido y un grupo alcohol (2,3-Epoxy-1-propanol) considerado genotóxico y carcinógeno. Fue detectado por primera vez en aceite de palma y en cantidades más pequeñas en otros aceites refinados (Weibhaar y Pertz,

2010). Durante el proceso de refinado de los aceites, principalmente durante la fase de desodorización, reacciona con los diglicéridos generando ésteres del ácido graso glicidil (GE), los cuales se hidrolizan en el tracto gastrointestinal en su precursor glicidol.

Los estudios para dilucidar el mecanismo de formación de estos compuestos tóxicos esterificados muestran que en alimentos procesados térmicamente con baja actividad de agua y que contienen grasa, el 3-MCPD y sus ésteres se forman a partir de glicerol o/y acilgliceroles (triacilgliceroles y diacilgliceroles) e iones cloruro, mientras que los GE se forman principalmente a partir de diacilgliceroles o monoacilgliceroles independientemente de la presencia de compuestos clorados. La formación de 3-MCPDE tiene lugar a temperaturas de 160-200 °C y el proceso de formación no se acelera a temperaturas más elevadas, mientras que la formación de GE se inicia a >200 °C, viéndose incrementada de manera exponencial a una temperatura creciente cuando los diacilgliceroles superan en un 3-4 % los lípidos totales.

La mayor parte de aceites no refinados no contienen niveles detectables de 3-MCPDE ni GE sin embargo, tienen distintas capacidades para formar 3-MCPDE y GE durante la desodorización del proceso de refinado. Entre los factores que contribuyen a esta variación se incluyen el clima, el terreno y las condiciones de cultivo de las plantas, su genotipo, las técnicas de recogida y las condiciones de procesamiento, que afectan, todos ellos, a los niveles de precursores de 3-MCPDE y GE (acilgliceroles y compuestos que contienen cloro). En general, los niveles de 3-MCPDE y GE en alimentos elaborados con aceites refinados se corresponden con las concentraciones de 3-MCPDE y GE en los propios aceites. En la actualidad preocupa especialmente la presencia de estos compuestos en fórmulas infantiles.

### 2.2.1 Caracterización toxicológica

La presencia de cloropropanoles en los alimentos es preocupante debido a sus propiedades toxicológicas. En el momento actual no se dispone de suficiente información toxicológica sobre los cloroésteres y GE en los alimentos para poder evaluar su importancia sobre la salud. Sin embargo, los datos toxicocinéticos indican que los 3-MCPDE y GE se descomponen en sus formas no esterificadas, por lo que las evaluaciones toxicológicas llevadas a cabo se basan en el 3-MCPD y el glicidol, compuestos para los que se dispone de datos toxicológicos (JECFA, 2016).

El 3-MCPD ha sido clasificado como posible agente carcinógeno (Grupo 2B) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2012), al provocar infertilidad y disminución en la actividad del sistema inmunológico en ratas de experimentación, lo que provoca cáncer de testículo y de riñón. La evaluación llevada a cabo en 2001 por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) reunió los estudios de toxicidad a corto y largo plazo concluyendo que el riñón y los testículos son los órganos diana y demostrando su actividad mutagénica *in vitro* en ausencia de estudios clínicos o epidemiológicos en humanos (JECFA, 2001). Por el contrario, el 2-MCPD no ha sido evaluado por la IARC y hasta la fecha no se ha confirmado su potencial toxicológico (efectos en los músculos estriados, corazón, riñón e hígado).

En relación al 1,3-DCP, JECFA concluyó en 1993 que es cancerígeno y que se debería reducir su contenido en los alimentos tanto como fuera posible. Actualmente se reconoce que tiene hepato-

toxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, teratogénesis y mutagenicidad (Lu et al., 2014), además muestra similitudes de estructura-actividad con otros conocidos carcinógenos identificados por la IARC, y ha sido clasificado como posiblemente cancerígeno para los seres humanos (grupo 2B) (IARC, 2012). Hoy en día, el interés de su estudio se debe a su potencial tóxico como carcinógeno a través de mecanismo genotóxico, y a que actúa como un disruptor endocrino en los seres humanos y animales. El 2,3-DCP además de toxicidad testicular, hepática y renal produce efectos de inmunotoxicidad en las células T tanto *in vivo* como *in vitro* (Lu et al., 2013).

En 2001, JECFA asignó provisionalmente un valor máximo tolerable de ingestión diaria por kg de peso (IDTMP) de 2 µg de 3-MCPD basándose en el nivel más bajo con efecto observado (LOEL) y un factor de seguridad de 5 para la extrapolación desde el LOEL hasta el nivel sin efecto observado (NOEL) (JECFA, 2001), dicho valor fue ratificado en 2006 (JECFA, 2006). Posteriormente, JECFA determinó una ingesta diaria tolerable máxima provisional (IDTMP) de 4 µg/kg p.c. para el 3-MCPD y los 3-MCPDE (de forma individual o combinada, expresada como equivalentes del 3-MCPD) con base en la hiperplasia tubular renal en ratas macho (JECFA, 2016).

Por su parte, el Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF) adoptó en 2001 una ingesta diaria tolerable (TDI) de 2 µg/kg p.c. para el 3-MCPD (SCF, 2001). En 2016, el Panel Científico sobre Contaminantes en la Cadena Alimentaria (CONTAM) de EFSA concluyó que no era posible mantener la TDI previamente establecida para el 3-MCPD y determinó una ingesta diaria tolerable (IDT) de 0,8 µg/kg p.c./día para la suma de 3-MCPD y sus ésteres de ácidos grasos basándose en la evidencia científica que vincula esta sustancia con nefrotoxicidad en ensayos de experimentación animal (EFSA, 2016). Ante la divergencia de opinión con JECFA, EFSA ha revisado dicho valor y basándose en el nuevo enfoque "Benchmark dose" (BMDL<sub>10</sub> de 0,20 mg/kg p.c./día para efectos renales) ha establecido una TDI de 2 µg/kg p.c./día, más cercana a la posición de JECFA, a la vez que recomienda la realización de estudios adicionales para confirmar la toxicidad del 3-MCPD (EFSA, 2018).

Por otra parte, el glicidol ha sido clasificado como probable agente carcinogénico (Grupo 2A) por la IARC (2000). Actualmente se considera probado que el glicidol, precursor del GE, es genotóxico y cancerígeno, por lo que no se puede establecer un nivel de seguridad para la ingesta de ésteres de ácidos grasos de glicidilo (expresados como glicidol). En su lugar JECFA aplica la aproximación del margen de exposición (MOE) calculado a partir del límite más bajo de confianza en la dosis de referencia BMDL<sub>10</sub> de 2,4 mg/kg p.c./día para los mesoteliomas en ratas macho mientras que EFSA ha usado la T<sub>25</sub> de 10,2 mg/kg p.c./día para los efectos neoplásicos en ratas como punto de referencia toxicológico, considerándose que un margen de exposición inferior a 10 000 y 25 000, respectivamente es preocupante para la salud (EFSA, 2016) (JECFA, 2016).

## 2.2.2 Evaluación de la exposición y riesgo para la población infantil

Diversos informes científicos publicados en los últimos años ponen de manifiesto la presencia de cloropropanoles y cloroésteres en los alimentos. La opinión publicada por el Instituto Alemán de Evaluación de Riesgos (BfR) sobre ésteres de 3-MCPD concluyó la existencia de altos niveles de ésteres de 3-MCPD en grasas y aceites vegetales refinados, aceites de fritura, crema de avellanas y en preparados infantiles (BfR, 2007). El informe de la Agencia Británica de Seguridad Alimentaria

(FSA) señaló que los contenidos más altos de 3-MCPD se encontraron en las galletas y pastas (FSA, 2009). El Instituto Internacional de Ciencias de Salud (ILSI) publicó datos que relaciona la presencia de ésteres de 3-MCPD con alimentos derivados de cereales, café, pescado, carne, patatas, frutos secos y aceites refinados (ILSI, 2011). La opinión científica publicada por EFSA (2016) señaló que los valores promedio más altos de GE, así como 3-MCPD y 2-MCPD y sus ésteres se encontraron en los aceites de palma y en las grasas de palma y que eran 5 a 10 veces más altos que los valores promedio encontrados en la mayoría de los demás aceites comestibles refinados.

Los estudios más recientes han concluido que la exposición de la población a los 3-MCPDE y GE se produce principalmente por consumo de aceites vegetales refinados y productos alimenticios que los contengan (productos de patata y productos de panadería fina), incluyendo preparados para lactantes.

En la Unión Europea (UE), la evaluación de los datos analíticos sobre la presencia de 3-MCPD/GE en los alimentos aportados por diversos países demostró que los aceites comestibles aportaban la mayor contribución a la ingesta diaria de estos contaminantes y que las margarinas, y los productos de bollería y pastelería eran las principales fuentes de exposición a dichos contaminantes químicos para la población infantil a partir de 3 años y para la población joven. Asimismo, se estimó para niños alimentados exclusivamente con fórmulas infantiles una ingesta diaria promedio de 2,4 mg/kg p.c. y de 1,8 a 2,1 mg/kg p.c. para el 3-MCPD y glicidol, respectivamente (EFSA, 2013, 2016). De acuerdo a la última evaluación de la exposición estimada por EFSA (2018), la exposición media al 3-MCPD y a sus ésteres no se excede en la población adulta mientras que se encuentra por encima de su estimación de una dosis segura en los grupos de edades jóvenes de mayor consumo, incluyendo adolescentes (hasta los 18 años de edad), y en particular para los lactantes que consumen solamente fórmulas infantiles. Para este grupo poblacional la ingesta diaria de 3-MCPD puede ser tres veces superior a la IDT, constituyendo por ello una preocupación potencial para la salud de dichos grupos de población.

Por su parte, JECFA (2016) concluyó que la exposición alimenticia estimada al 3-MCPD para la población general, incluso para los grandes consumidores, no excedía su dosis segura. Sin embargo, la media de la exposición alimentaria al 3-MCPD de los grupos alimentados con preparados para lactantes excedía la IDTMP 2,5 veces.

Respecto al glicidol, tanto EFSA (2016) como JECFA (2016) han encontrado evidencia científica de que es genotóxico y cancerígeno, y suponiendo una conversión completa de los ésteres en glicidol después de la ingestión, ambos organismos han propuesto un margen de exposición (MOE) alto a estos compuestos para no afectar a la salud del consumidor. JECFA (2016) estimó que los límites más bajos de los rangos de los MOE determinados para los lactantes, niños y adultos (inferiores a 10 000) puede suponer un problema de salud, y EFSA (2016) concluyó que los GE son una preocupación potencial para la salud de los grupos de edad de jóvenes con una exposición promedio, y para todos los grupos de edad con una alta exposición, y que la exposición de los lactantes que consumen exclusivamente fórmulas infantiles es especialmente preocupante por la presencia de aceites vegetales en dichas fórmulas (MOE de 5 400 y 2 100 para una exposición promedio y alta exposición, respectivamente).

Las fórmulas infantiles como sustitutos de la leche materna se elaboran a partir de aceites vegetales para conseguir un perfil cualitativo y cuantitativo de ácidos grasos similar a la leche materna. Sin embargo, la información disponible sobre la presencia de cloropropanoles y cloroésteres en estos productos que constituyen la base de la dieta de los lactantes aún es muy limitada.

En general los resultados publicados hasta la fecha aportan las siguientes conclusiones: aunque no se detecta 3-MCPD libre el contenido de MCPDE y GE encontrado en fórmulas infantiles comercializadas constituye un riesgo potencial para la salud de los lactantes; se ha observado una variación importante en los niveles de 3-MCPDE y GE en los preparados para lactantes que puede deberse a los tipos de aceites empleados en estos preparados; el contenido más alto determinado para ésteres glicídicos de ácido palmítico y oleico es consistente con la composición de la leche infantil en estos ácidos grasos a partir de los aceites vegetales refinados añadidos; los ésteres de 2-MCPD se encuentran en una concentración equivalente a la mitad de los ésteres de 3-MCPD; se observa una tendencia de reducción de la concentración en el tiempo lo que sugiere la posibilidad de implantar medidas de mitigación en el proceso de elaboración (Zelinková et al., 2009) (Becalski et al., 2015) (Wöhrlin et al., 2015) (Jędrkiewicz et al., 2016) (Leigh y MacMahon, 2017) (Pavesi et al., 2017).

### 2.2.3 Estrategias de gestión del riesgo

Según lo establecido en la Recomendación 2014/661/UE, la industria ha ido adaptando sus procesos para el control de la presencia de 2- y 3-MCPD, de ésteres de ácidos grasos de 2- y 3-MCPD y de ésteres glicídicos de ácidos grasos en los alimentos (UE, 2014). Así, diversas organizaciones como la Federación europea de la industria aceitera (FEDIOL, 2015) y la Federación Alemana de Derecho Alimentario y Ciencia de los Alimentos (BLL, 2016) han desarrollado pautas para reducir los 3-MCPDE y GE en aceites refinados y en alimentos que los contienen.

En 2008, el *Codex Alimentarius* estableció un Código de prácticas (CAC/RCP 64-2008) relativo a los 3-MCPD en proteínas vegetales hidrolizadas mediante ácido y recientemente, el Comité del *Codex* sobre contaminantes de los alimentos (CCCF, 2018) ha presentado un anteproyecto de Código de prácticas para reducir los ésteres de 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPDE) y los ésteres glicídicos (GE) en los aceites refinados, especialmente en los preparados para lactantes, basado en tres estrategias de gestión: buenas prácticas agrícolas, buenas prácticas de fabricación, y selección y usos de los aceites refinados en productos alimenticios elaborados a partir de estos aceites, incluyendo los preparados para lactantes. En relación a esta última se recomienda seleccionar aceites vegetales refinados con niveles más bajos de 3-MCPDE y GE (ya sea por su menor contenido natural o por la aplicación de medidas de atenuación) y reducir la cantidad de aceites vegetales refinados en los productos terminados aunque esto podría afectar a las cualidades organolépticas o nutricionales de los productos terminados.

En la UE se establecieron en primer lugar niveles máximos permitidos de 20 µg/kg para proteína vegetal hidrolizada y salsa de soja (Reglamento (CE) N° 1881/2006 (UE, 2006)). Dicho Reglamento ha sido modificado recientemente por el Reglamento (CE) N° 2018/290 (UE, 2018) que añade los límites de los ésteres glicídicos de 1 000 µg/kg para cualquier aceite y grasa vegetal disponible en el mer-

cado, bien para consumo directo, bien para su uso como ingrediente en alimentos, y de 500 µg/kg en el caso de aceites y grasas vegetales destinados a la producción de alimentos infantiles y alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad. Asimismo, considerando el riesgo de exposición de los lactantes únicamente alimentados con preparados para lactantes, se limita el contenido máximo de ésteres glicidílicos de ácidos grasos expresados como glicidol a 50 µg/kg y 6 µg/kg en preparados para lactantes, preparados de continuación y en alimentos para usos médicos especiales, en polvo y líquido respectivamente. No obstante, la Comisión considera que es preciso reducir aún más la presencia de GE en estos alimentos una vez que se disponga de metodología fiable para determinar contenidos más estrictos.

Por otra parte, la UE ha establecido para la epiclorhidrina un límite máximo de migración específica en materiales y plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos de 1 mg/kg (UE, 2011).

El Reglamento (CE) N° 333/2007 (UE, 2007) establece requisitos de muestreo para el control oficial sobre el contenido de 3-MCPD en alimentos, si bien no se ha establecido a nivel comunitario ningún método específico para la determinación de 3-MCPD en productos alimenticios, por lo que los laboratorios podrán escoger cualquier método de análisis validado (a ser posible, la validación incluirá un material de referencia certificado), siempre que el método seleccionado cumpla los criterios de funcionamiento específicos.

Para determinar el MCPD y el glicidol ligados en forma de ésteres, la Comisión (UE, 2014) recomienda utilizar los métodos normalizados de la *American Oil Chemists' Society* (AOCS). Estos métodos basados en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) han sido validados por un estudio colaborativo en relación con los aceites y grasas vegetales. Se recomienda que el límite de cuantificación no sea superior a 100 µg/kg para el análisis de MCPD y glicidol ligados en forma de ésteres de ácidos grasos en los aceites y grasas comestibles. En el caso de otros alimentos que contengan más de un 10 % de grasa, es preferible que el límite de cuantificación no sea superior cuando esté relacionado con el contenido en grasas del alimento, es decir, el límite de cuantificación para el análisis de ésteres de ácidos grasos de MCPD y glicidol en los alimentos que contengan un 20 % de materia grasa no debe ser superior a 20 µg/kg en relación con el peso total. En el caso de los alimentos que contengan menos de un 10 % de materia grasa, el límite de cuantificación no debe ser superior a 10 µg/kg en relación con el peso total. Asimismo, los laboratorios deben disponer de procedimientos de control de calidad para evitar que, durante el análisis, los ésteres glicidílicos se transformen en ésteres de MCPD y viceversa. Además, es necesario especificar inequívocamente el mensurando e informar por separado sobre el 2- y el 3-MCPD libres presentes en la matriz analizada que procedan de ésteres de ácidos grasos de 2- y 3-MCPD, pues ambos se miden como 3-MCPD. Debe informarse por separado sobre los mensurandos siguientes: 2-MCPD, 3-MCPD, ésteres de 2-MCPD, ésteres de 3-MCPD y ésteres glicidílicos.

El análisis de los diversos mono y diésteres 3-MCPD y ésteres glicidílicos es muy complejo y para su determinación en los alimentos se dispone de métodos analíticos directos e indirectos.

Los métodos indirectos requieren la hidrólisis alcalina o ácida de los ésteres de los ácidos grasos del glicidol o el MCPDE antes medir la cantidad total de 3-MCPD y de glicidol sin diferenciar los

tipos de éster mediante GC-MS. Tienen la ventaja de proporcionar límites de detección muy bajos pero exigen un control de las condiciones de análisis debido a la capacidad del 3-MCPD y glicidol de interconvertirse fácilmente. La AOCS (AOCS, 2013a, b, c) ha establecido tres métodos indirectos interlaboratorios validados para determinar los 3-MCPDE y GE en aceites y grasas comestibles (Métodos Cd 29a-13, Cd 29b-13, y Cd 29c-13) y recientemente el *Joint Research Center* (JRC) ha publicado el estudio de validación de un método de análisis de MCPDE y GE en diversas matrices alimentarias (productos de panadería, pescado ahumado, carne ahumada, margarina, productos a base de cereales) (JRC, 2017).

La determinación directa de ésteres 3-MCPD y ésteres glicidílicos se basa en un aislamiento de los analitos generalmente por extracción en fase sólida y la identificación individual de cada uno de ellos mediante HPLC-MS. Estos métodos proporcionan un menor grado de incertidumbre en la cuantificación de los analitos pero exigen una gama de estándares de referencia que aún no se encuentran disponibles para todos los tipos de ésteres. Actualmente se dispone de un método directo para cuantificar siete ésteres glicidílicos (C12-C18), usando dos operaciones consecutivas de extracción en fase sólida seguidas de LC-MS basada en una reciente versión de AOCS (*American Oil Chemists' Society*) (Eurofins). Haines et al. (2011) desarrollaron un método directo para la determinación de ésteres de 3-MCPD y de glicidol en aceites y grasas comestibles basado en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-TOFMS).

Para alimentos que contengan aceites refinados, especialmente fórmulas infantiles, se han validado pocos métodos, tanto directos como indirectos. Recientemente se ha publicado la validación de un método para la determinación de ésteres 3-MCPD concretos y ésteres glicidílicos en fórmulas infantiles basado en una extracción líquido-líquido de la grasa, purificación mediante extracción en fase sólida y posterior cuantificación por LC-MS/MS (Leigh y MacMahon, 2016).

## 2.2.4 Pasos futuros

La información toxicológica disponible sobre el 2-MCPD es demasiado limitada para establecer un nivel seguro de ingesta.

Hacen falta más datos sobre la presencia de ésteres de ácidos grasos de MCPD y de ésteres glicidílicos de ácidos grasos en fórmulas infantiles y alimentos para lactantes para abordar una evaluación más exacta de la exposición.

A pesar de los avances logrados, EFSA insiste en la recomendación de una reducción significativa de 3-MCPD/GE en los productos alimenticios para lactantes, y JECFA viene recomendando que se haga lo posible para reducir los 3-MCPDE y al 3-MCPD en los preparados para lactantes y que se continúen las medidas para reducir los GE y el glicidol en grasas y aceites, especialmente los empleados en los preparados para lactantes.

## 2.3 Furano y derivados

### 2.3.1 Identificación y caracterización del peligro

El furano (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O; CAS No. 110-00-9) es un compuesto orgánico heterocíclico aromático con un átomo de oxígeno, es lipofílico y muy volátil con una temperatura de ebullición de 32 °C. Es un líquido

transparente e incoloro que se obtiene industrialmente mediante la descarbonilación catalítica del furfural y se utiliza como intermediario en la producción de sustancias químicas para la industria y la agricultura (producción de lacas, como disolvente para resinas, insecticidas, estabilizantes y productos farmacéuticos).

Además de su aplicación industrial, el furano y sus derivados metilfurano (2-metilfurano, 3-metilfurano y 2,5-dimetilfurano) forman parte de un grupo de compuestos orgánicos que se forman de manera natural en alimentos procesados a altas temperaturas o por exposición a radiación ionizante o ultravioleta. Dichos compuestos se asocian desde hace mucho tiempo a los aromas de los alimentos (FAO/OMS, 2011).

En 2004, la *Food and Drug Administration* (FDA) informó de su presencia en alimentos enlatados y envasados en vidrio (alimentos para bebés, preparados para lactantes, hortalizas en conserva, frijoles horneados, sopas, salsas, estofados y carnes y pescados en conserva) y posteriormente en una gran variedad de alimentos sometidos a procesos térmicos como café, cerveza, zumos de fruta y de hortalizas, salsa de soja, bebidas nutricionales y alimentos a base de cereales, como galletas, *crackers*, cereales para el desayuno y pan. En general el contenido de furano es mayor en los alimentos envasados (FDA, 2004a, 2006, 2007, 2008).

Según los datos más recientes publicados por EFSA en 2017, las mayores concentraciones de furano se encontraron en los granos de café tostados enteros, seguidos del café molido tostado, sólidos de café no especificados e imitaciones de café y, en menor grado, café instantáneo en polvo. También se detectaron concentraciones medias en alimentos compuestos basados en cereales y verduras, comidas listas para el consumo para lactantes y niños pequeños, salsa de soja, pan y bollos, pasta cruda, cereales para el desayuno, productos de panadería fina y licores. Asimismo, se informó de la presencia de 2-metilfurano, 3-metilfurano y 2,5-dimetilfurano en diversos alimentos con ratios 2-metilfurano/furano de 4 (café), 1,4 (cereales para niños), 1,1 (cereales de desayuno) y 0,23 (comidas listas para el consumo para lactantes y niños pequeños) (EFSA, 2017). No obstante, según la Agencia Británica de Seguridad Alimentaria (FSA) la tendencia observada sobre la presencia de este contaminante de procesos en los alimentos de mayor riesgo, incluidos los alimentos para niños, no supone actualmente un aumento de la preocupación para la salud humana (FSA, 2017).

El furano se produce en los alimentos sometidos al calor y se han documentado diferentes mecanismos de formación a partir de diversos precursores presentes de forma natural en los alimentos, entre ellos se incluye la degradación térmica de azúcares reductores con o sin aminoácidos, la degradación térmica de aminoácidos, la oxidación térmica del ácido ascórbico y de ácidos grasos poliinsaturados y carotenoides (Crews y Castle, 2007).

Diversos estudios coinciden en que la degradación de ácido ascórbico a partir de 120 °C constituye la vía más importante de formación de furano en los alimentos, si bien, algunas investigaciones señalan que los alimentos ricos en carbohidratos son más propensos a la formación de furano debido probablemente a la reacción de Maillard y que la retención de furanos en los alimentos se relaciona con la fracción lipídica especialmente de ácidos grasos poliinsaturados, motivo por el cual los alimentos ricos en carbohidratos sometidos a procesos de fritura son especialmente

susceptibles. Los experimentos en sistemas modelo han confirmado la formación de furano por pirólisis de azúcares, principalmente eritrosa seguido de ribosa, sacarosa, glucosa y fructosa. Asimismo, los aminoácidos como serina y cisteína pueden generar furano por pirólisis en ausencia de carbohidratos y los ácidos grasos poliinsaturados como linoleico y linolénico fueron considerados precursores de furano durante el tratamiento térmico a 120 °C durante 25 minutos (Fan, 2015). En general el nivel de furano tiende a ser mayor en alimentos con mezclas complejas de carbohidratos, grasa y proteína (FAO/OMS, 2011).

Además de los precursores citados (azúcares, aminoácidos, ácidos grasos insaturados y carotenoides) se ha investigado el papel de algunos metales como el cobre como posibles catalizadores de la formación de furano en los alimentos (Lawely et al., 2012). Asimismo, se ha evaluado la influencia de otros factores como el pH y el potencial redox aunque los resultados no son concluyentes. En condiciones ácidas los azúcares pierden eficiencia como precursores de furano y sin embargo dichas condiciones favorecen la conversión del ácido ascórbico en furano (EFSA, 2017). Durante el almacenamiento de alimentos a 25 °C durante 3 días la formación de furano fue 3,5 veces mayor a pH 9 que a pH 3 o 6 (Fan, 2015). También hay evidencias de que el uso de antioxidantes reduce la formación de furano (EFSA, 2017), siendo más efectivos los compuestos liposolubles (BHT y  $\alpha$ -tocoferol) a excepción del ácido cafeico (Zheng et al., 2015), aunque el efecto mitigante de la formación de furano ejercido por los antioxidantes disminuye con el tiempo de tratamiento térmico (Shen et al., 2017).

Por otra parte, se ha demostrado que el furano se puede formar en alimentos no sometidos a procesos térmicos, a partir de carbohidratos y ácido ascórbico sometidos a radiación ionizante (Fan, 2005a, b) (Fan y Geveke, 2007) (Fan y Sokorai, 2008). También el tratamiento con radiación UV-C (11,5 J/cm<sup>2</sup>) originó la formación de furano a partir de los ácidos grasos linoleico y linolénico, mientras que la irradiación gamma hasta 20 kGy no indujo la formación de cantidades significativas de furano a partir de los ácidos mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico (Fan, 2015), e incluso a dosis inferiores a 10 kGy redujo significativamente el contenido de furano formado en alimentos cárnicos listos para el consumo (Fan y Sommers, 2006).

Al margen de las características propias de los alimentos, la concentración final de furano en el momento del consumo depende de las condiciones de transformación y preparación de los mismos. Diversos estudios relacionan la formación de furano con temperaturas superiores a 120 °C, incluso puede formarse durante el recalentamiento de alimentos procesados en envases cerrados. En este sentido, los alimentos para niños a base de hortalizas, mezclas de carne y verduras o de frutas que se elaboran comúnmente con aplicación de calor a altas temperaturas en recipientes sellados, son especialmente susceptibles a la formación de furano. En este tipo de alimentos los niveles más altos de furano se relacionaron más con productos de hortalizas que de frutas, con productos esterilizados en lugar de pasteurizados y con un contenido de vitamina C (natural o añadido) y pH más elevado (Arisseto y Toledo, 2008). En el proceso de tostado de pan el nivel de furano aumentó con el tiempo de tostado y con el grado de dorado (FAO/OMS, 2011). Otro estudio reveló que las barritas de pescado fritas presentaban una concentración de furano superior cuando se usaba aceite de oliva (30 µg/g) en lugar de aceite de girasol (20 µg/g) y que cuando se cocinaban al horno

se generaba mucha menos cantidad (10 µg/g), demostrándose que la cantidad de furano es menor según disminuye la temperatura y el tiempo de fritura (Pérez Palacios et al., 2013).

Por otra parte, diversos estudios han evidenciado una pérdida de furano por evaporación en la preparación por el consumidor de alimentos listos para el consumo. Dicha pérdida se atribuye a la inestabilidad y volatilidad del furano en los alimentos después de preparar o abrir productos comerciales y se relaciona con la temperatura del producto y con el tiempo de exposición a la atmósfera.

En el caso del café los diferentes métodos de preparación determinaron la pérdida de furano en diferente grado, así en café hervido/turco la pérdida fue de 3 a 4 veces mayor que en café preparado con filtro y expreso. También se ha documentado que los niveles de furano disminuían en bebidas de café cuando se dejaban reposar a temperatura ambiente hasta 20 minutos sin tapa y que los niveles de furano en café preparado en máquinas automáticas eran más altos que en máquinas caseras debido a la retención mayor de furano en el sistema cerrado de las automáticas (FAO/OMS, 2011).

Asimismo, se ha estudiado la influencia del recalentamiento de los alimentos comercialmente procesados respecto a la concentración de furano y, aunque la información es todavía muy limitada, se ha indicado que la práctica de recalentar los alimentos procesados comerciales destinados a población infantil mediante un baño de agua caliente sin tapa puede reducir su exposición en un 15-30 % (EFSA, 2017). Igualmente, se ha documentado que remover las muestras en lata y en frasco de alimentos para bebés aumentaba la liberación de furano, en comparación con dejar los alimentos sin moverse y que, por otra parte, el aceite añadido a alimentos para bebés calentados antes de su consumo producía una retención mayor de furano que los que no tenían aceite añadido (FAO/OMS, 2011). También se ha observado una pérdida de furano después de recalentar al microondas barritas de pescado fritas (Pérez Palacios et al., 2013). Por el contrario, otros investigadores no encontraron reducciones significativas en el contenido de furano por aplicación de calor ni por remover alimentos preparados o calentar frascos de alimentos comerciales para niños en un calentador especial para alimentos infantiles (FAO/OMS, 2011).

Tal y como informó la Agencia Británica de Investigación para los Alimentos y el Medio Ambiente (FERA) la pérdida por evaporación de furano de los alimentos supone otra fuente potencial de exposición por inhalación, debido a la presencia de furano en el aire doméstico, especialmente tras la fritura de patatas en recipiente abierto, la preparación de café y el horneado de algunos alimentos (FERA, 2009).

### 2.3.1.1 Caracterización toxicológica

De acuerdo con la información obtenida de estudios *in vitro* e *in vivo* en animales, el furano puede pasar fácilmente a través de las membranas biológicas y después de la administración oral a ratones y ratas es rápidamente absorbido a nivel del tracto gastrointestinal. El furano tiene una vida media corta, se metaboliza por el citocromo P450 2E1 (CYP2E1) al metabolito reactivo, cis-but-2-eno-1,4-dialdehído (BDA) y se elimina en la orina y las heces como metabolitos, y se exhala al aire como furano sin modificar y dióxido de carbono formado a consecuencia de la apertura de los anillos. El furano es citotóxico y afecta principalmente al hígado (EFSA, 2004) (JECFA, 2011).

Diversos estudios realizados en ratas han evidenciado su potencial cancerígeno y por esta razón ha sido clasificado en el grupo 2B (posible cancerígeno en humanos) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 1995). Aunque el mecanismo de cancerogenicidad no está claramente definido existen evidencias científicas de genotoxicidad *in vitro* del metabolito BDA formado *in vivo* a partir del furano, y en base al peso de la evidencia, el furano es considerado como carcinógeno genotóxico para la evaluación del riesgo por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2004, 2017).

La mayor preocupación para la salud humana corresponde a su efecto debido a una exposición crónica a través de la dieta (Lawley et al., 2012). Los diversos estudios realizados con animales de experimentación concluyeron que el daño hepático (colangiofibrosis) y el cáncer de hígado (adenoma y carcinoma) eran los efectos más críticos para la salud relacionados con el furano. En dosis altas (<30 µg/kg p.c./día) puede afectar también a riñón y pulmón.

La Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos (NAS) calculó una BMDL<sub>01</sub> de 0,09 mg/kg p.c./día para el efecto crítico de colangiocarcinoma inducido por furano (NAS, 2000). En 2010, JECFA examinó la inducción de adenomas hepatocelulares y carcinomas en ratones hembras como punto final pertinente y calculó una BMDL<sub>10</sub> de 1,3 mg/kg p.c./día, correspondiente a 0,96 mg/kg p.c./día al ajustarse de un programa de dosificación de 5 días a la semana a una dosis promedio diaria (FAO/OMS, 2011). En 2012, la Autoridad Noruega de Seguridad Alimentaria (VKM) calculó una BMDL<sub>10</sub> de 0,02 mg/kg p.c./día para el riesgo de colangiocarcinoma aplicando un factor de corrección de 7 a la dosis obtenida de un estudio de 9 meses de duración (VKM, 2012). En 2017, el Panel CONTAM examinó la información toxicológica y consideró como punto de referencia una BMDL<sub>10</sub> de 0,064 mg/kg p.c./día y de 1,31 mg/kg p.c./día para efectos no neoplásicos (colangiofibrosis) y efectos neoplásicos (adenoma y carcinoma hepatocelular), respectivamente (EFSA, 2017).

Hasta el momento no se han podido identificar los puntos de referencia toxicológicos para los metilfuranos aunque en base a la información disponible se asume un efecto aditivo de hepatotoxicidad asociado a furano, 2-metilfurano y 3-metilfurano, si bien aún se desconoce el potencial hepatotóxico *in vivo* del 2,5-dimetilfurano (EFSA, 2017).

### 2.3.2 Evaluación de la exposición a través de la dieta y caracterización del riesgo para la salud humana

En 2004, la FDA de los Estados Unidos alertó de la presencia de furanos en los alimentos como un problema emergente de seguridad alimentaria y EFSA publicó su primera evaluación provisional sobre la presencia de furanos en los alimentos advirtiendo que había una diferencia relativamente pequeña entre la exposición humana y la dosis que produce efectos cancerígenos en animales de laboratorio (EFSA, 2004).

Posteriormente, a partir de los datos de la presencia de furano en los alimentos sometidos a tratamiento térmico aportados por los Estados miembros, EFSA ha publicado diferentes informes de seguimiento en 2009, 2010, 2011 y 2017. El análisis de los mismos confirmó que el café es el alimento que más contribuye a la ingesta de furanos para los adultos seguido de la cerveza y las sopas instantáneas. Los cereales y los productos a base de cereales son los que más contribuyen en niños y

adolescentes. Para niños pequeños fueron zumos de frutas, productos a base de leche y productos a base de cereales, y los alimentos para bebés, los cuales se convirtieron en los contribuyentes principales para este grupo de edad (EFSA, 2017).

Los resultados de los estudios publicados de exposición al furano a través de la dieta coinciden en que las estimaciones más altas se asocian al grupo de población infantil y aunque el margen de exposición para la mayoría de consumidores indica una baja preocupación para la salud, para la población con hábitos de consumo extremo, la exposición es hasta tres veces mayor de lo que se considera de baja preocupación para la salud pública.

En la Unión Europea las exposiciones dietéticas medias calculadas para lactantes variaron de 0,14 a 0,99  $\mu\text{g}/\text{kg p.c.}/\text{día}$  mientras que para los adultos la ingesta media fue de 0,78  $\mu\text{g}/\text{kg p.c.}/\text{día}$ . En cuanto a las exposiciones correspondientes a percentiles 95, las estimaciones más altas también se observaron para lactantes (0,27 a 1,8  $\mu\text{g}/\text{kg p.c.}/\text{día}$ ). Además, EFSA estimó que la exposición calculada podría ser mayor por la presencia de 2- y 3-metilfurano en los alimentos, ya que en muchos de los alimentos los niveles de 2-metilfurano son incluso más altos que de furano (EFSA, 2017).

Con todos los datos disponibles la Organización Mundial de la Salud (OMS) al igual que EFSA y otras instituciones y autoridades sanitarias, han informado que la exposición estimada a los furanos y metilfuranos a través de los alimentos podría provocar un posible daño hepático a largo plazo, y han considerado especialmente preocupante el nivel de exposición estimado para la población infantil a través del consumo de alimentos enlatados o listos para el consumo. No obstante, y en base a las incertidumbres existentes, coinciden en considerar que hay una mayor probabilidad de sobreestimación que de subestimación del riesgo, y que es necesario disponer de nuevos datos sobre métodos de análisis, presencia, formación, exposición y toxicidad, especialmente de los metilfuranos para abordar una evaluación del riesgo más realista (FDA, 2004b) (FERA, 2009) (FSA, 2012) (JECFA, 2011) (VKM, 2012) (ANSES, 2016) (Health Canada, 2016) (EFSA, 2017).

### 2.3.3 Estrategias de gestión y mitigación del riesgo

Hasta el momento en el ámbito europeo no se han definido límites legales de concentración de furano en los alimentos ni tampoco se ha propuesto la metodología oficial de análisis para la determinación de furano en los alimentos.

La Comisión Europea publicó en 2007 una recomendación relativa al seguimiento de la presencia de furano en alimentos (UE, 2007a) por la que instaba a los Estados miembros de la UE a realizar, durante los años 2007 y 2008, un seguimiento de la presencia de furano en productos alimenticios sometidos a tratamiento térmico. Posteriormente EFSA recomendó que los controles de furano se realicen en productos tratados con calor para los que se dispone de pocos datos y que, siempre que sea posible, se analice la misma muestra tal y como se compra, y después de prepararla para su consumo, indicando el modo de preparación seguido (tiempo, temperatura e información de manipulación) (EFSA, 2011).

Desde el punto de vista analítico, la Comisión Europea recomendó seguir los procedimientos de muestreo contemplados en la parte B del anexo del Reglamento (CE) N° 333/2007 para garantizar que las muestras fueran representativas del lote objeto de muestreo y una preparación cuidadosa

de las muestras previa al análisis para garantizar que no se altere el contenido de furano de la muestra (UE, 2007b).

La FDA desarrolló en 2004 la metodología de análisis para la determinación cuantitativa de furano en alimentos basada en la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con automuestreador headspace (HS-GC/MS) (FDA, 2004c). Posteriormente numerosos investigadores han propuesto la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a GC/MS como técnica alternativa aunque no ha quedado demostrada la mejora en términos de sensibilidad.

Recientemente se han publicado los resultados de validación de un método analítico selectivo para el análisis de furano y derivados (2-metilfurano, 2-etilfurano, 2-butilfurano, 2-pentilfurano, 2-acetilfurano, furfural y furfuryl alcohol) en alimentos infantiles basado en la microextracción en fase sólida por espacio en cabeza acoplada a GC/MS (HS-SPME-GC/MS). Los buenos resultados obtenidos en términos de precisión (RSD <5,02-5,55 %), recuperación (98,42-99,8 %), linealidad (dos órdenes de magnitud) y sensibilidad (límite de detección y cuantificación de 0,018-0,035 ng/g y 0,060-0,117 ng/g, respectivamente) avalan su aplicación para la obtención de datos funcionales en el proceso de evaluación del riesgo (Concurso et al., 2018).

Por otra parte, considerando las numerosas incertidumbres que aún existen en relación a la cinética de formación y estabilidad del furano en los alimentos tampoco se han propuesto por parte de las autoridades sanitarias prácticas recomendadas para minimizar su presencia en los mismos. No obstante, se han evaluado experimentalmente las posibilidades de mitigación en alimentos, si bien la información es limitada y específica y no puede extrapolarse a otros alimentos ya que la formación de furano es claramente dependiente de cada tipo de matriz alimentaria.

A continuación, se relacionan las prácticas recomendadas en la preparación de alimentos en el ámbito doméstico extraídas de la bibliografía científica (Anese y Suman, 2013) (Pérez-Palacios et al., 2013) (Mesías y Morales, 2014) (Palmers et al., 2015) (Becalski et al., 2016) (Juaniz et al., 2016) (Rannou et al., 2016) (Cepeda-Vazquez et al., 2018):

- Respetar la recomendación de preparación que se informa en la etiqueta de los alimentos.
- Calentar o remover los alimentos envasados sin tapa, para permitir una volatilización parcial y dispersión del furano.
- Cocinar los alimentos en recipientes abiertos para permitir la evaporación del furano formado.
- Realizar una cocción al horno o al microondas, ya que estos métodos generan menos furano que la fritura.
- Ajustar las condiciones de fritura disminuyendo la temperatura y el tiempo a 160 °C durante 4 minutos.
- Esperar un tiempo adecuado (10 minutos) desde que se prepara el alimento hasta su consumo y removerlo con regularidad.
- Preparar café en sistemas que permitan bajos niveles, como filtrado con goteo o en máquinas que pasan directo desde el grano a la taza.
- Remover el café durante 5 minutos antes del consumo o almacenar en termo durante 8 horas.
- Moderar el tiempo y el grado de tueste del pan.

## 2.4 Hidrocarburos de aceites minerales

### 2.4.1 Identificación y caracterización del peligro

Los hidrocarburos de aceites minerales (HAM) son compuestos químicos obtenidos normalmente por destilación del petróleo crudo, aunque también se pueden producir sintéticamente a partir de cartón, gas natural y biomasa. Los HAM se utilizan en un gran número aplicaciones: en la industria alimentaria como aditivos o en materiales que están en contacto con alimentos, en maquinaria industrial como lubricantes o aceites de motor, en productos fitosanitarios, en piensos, tintas de impresión, en productos farmacéuticos y cosméticos. También se pueden generar de manera natural en organismos marinos, bacterias, hongos, plantas, insectos y a través de algunas operaciones del procesado de alimentos como los tratamientos térmicos y el refinado de aceites, entre otros. Por tanto, los HAM forman parte de nuestra vida cotidiana y pueden estar presentes en alimentos bien por su uso intencionado como aditivos alimentarios o coadyuvantes tecnológicos, o bien por diferentes vías de contaminación.

La denominación HAM es imprecisa y recoge mezclas muy heterogéneas y complejas de hidrocarburos con distinto número de carbonos y estructura tanto lineal como ramificada o cíclica. En función de su estructura general, los HAM se pueden clasificar en:

- Parafinas: alcanos lineales y ramificados.
- Naftenos: cicloalcanos con sustituyentes alquílicos.
- Aromáticos: hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) alquil sustituidos.

Todos ellos pueden contener pequeñas cantidades de compuestos nitrogenados y azufrados (EFSA, 2012) (AECOSAN, 2017).

En 2012, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) emitió una opinión científica sobre los HAM en contacto con alimentos y los definió como hidrocarburos que contienen entre 10 y 50 átomos de carbono, donde los aceites minerales crudos son los predominantes y los agrupó en dos categorías:

- Hidrocarburos saturados de aceites minerales (HSAM), que comprenden básicamente parafinas y naftenos. Pueden acumularse en algunos tejidos del cuerpo pudiendo causar daños en el hígado, ganglios linfáticos y el bazo.
- Hidrocarburos aromáticos de aceites minerales (HAAM), que están constituidos por HAP sustituidos con alquilo. Pueden actuar como carcinógenos genotóxicos y dañar el ADN.

Los alimentos pueden contener aceites minerales resultantes de su procesado, envasado, aditivos alimentarios, coadyuvantes tecnológicos o contaminantes ambientales. En este sentido, los expertos del Panel Científico de Contaminantes en la Cadena Alimentaria de EFSA (CONTAM), en 2012, identificaron las siguientes fuentes de contaminación en alimentos y piensos:

- Materiales en contacto con alimentos: papel y cartón reciclados, tintas de impresión *off-set* sobre papel y cartón para envases, aditivos en la fabricación de plásticos, papel y cartón encerados, sacos de yute o sisal tratados, lubricantes en la fabricación de envases metálicos, ceras aplicadas directamente sobre los alimentos y adhesivos.

- Contaminantes: a) origen medioambiental: aceite lubricante para motores sin catalizador, combustible sin quemar, restos de neumáticos y asfalto de carreteras; b) maquinaria empleada en la cosecha y el procesado de alimentos: gasóleo, lubricante de bombas, dosificadoras y otras máquinas, agentes de limpieza y disolventes.
- Aditivos alimentarios, coadyuvantes y otros usos: antiadherentes (panadería y confitería), tratamiento superficial (arroz), aglutinadores para aditivos menores, antiespumantes, agentes antipolvo (cereales), coformulantes de piensos y fitosanitarios.

Los HSAM, sobre todo la fracción que comprende cadenas de carbono de 16-35 átomos, pueden acumularse en el cuerpo humano, especialmente en los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado, pero, según EFSA, esto no se ha asociado con consecuencias adversas para la salud. Los HAAM con 3 o más anillos aromáticos monoalquilados o no alquilados pueden ser mutagénicos y carcinógenos por lo que los considera más preocupantes que la fracción de HSAM. En general, los toxicólogos se concentran en los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), especialmente en los HAP de 3-7 anillos, algunos de los cuales son cancerígenos, mientras que los sistemas de 1-2 anillos altamente alquilados no son genotóxicos y no se consideran preocupantes en cuanto a carcinogenicidad. En conclusión, la presencia de HAAM en sí misma no es indicativa de su potencial carcinogénico (FEICA, 2017).

EFSA (2012) no ha podido establecer un valor de ingesta diaria admisible (IDA), ya que considera que no son adecuados los valores de IDA tomados como referencia anteriormente (EFSA, 2009). Dadas las deficiencias en las bases de datos, EFSA ha decidido utilizar el enfoque del margen de exposición (MOE). Como no existen datos de dosis-respuesta de los HAAM relativos a su carcinogenicidad, EFSA no ha podido establecer un punto de referencia sobre el que se pueda basar el margen de exposición, pero considera una preocupación potencial la exposición a los HAAM a través de la alimentación.

En el caso de los HSAM, EFSA (2012) ha considerado como efecto crítico la formación de microgangliosomas en el hígado de ratas Fischer 344 en estudios de 90 días debidas a la presencia de HSAM con un número de átomos de carbono entre 16 y 35 procedentes de varios productos con HSAM para uso alimentario, en particular aceites blancos como agentes de liberación para el pan y la pulverización de granos. Se ha considerado 45 mg/kg p.c./día como referencia, tomado en base al NOAEL de los estudios revisados y se han establecido los MOE en base a los distintos escenarios posibles. Como conclusión, EFSA también ve una preocupación potencial asociada a los niveles actuales de estos HAM en Europa.

La opinión de EFSA (2012) proporciona una base para revisar las IDA de HAM de baja y media viscosidad para uso en alimentos. Estos HAM fueron evaluados por el anterior Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF) y el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) en 2002 (FAO/OMS, 2002) y se encuentran en revisión actualmente. Según EFSA, la acumulación de HSAM en ganglios linfáticos del intestino de animales de laboratorio es menos relevante para la salud humana de lo que se pensó cuando se estableció su IDA. EFSA considera de baja prioridad la revisión de las IDA de los HAM de alta viscosidad.

## 2.4.2 Evaluación de la exposición

Dada su presencia como mezclas complejas es imposible separar los compuestos individuales para cuantificarlos, con el problema añadido de la limitación en la disponibilidad de patrones analíticos certificados. Sí se puede medir la concentración de fracciones de saturados y de aromáticos por separado mediante cromatografía de gases. Actualmente el análisis de su presencia en alimentos consiste en una extracción seguida de pre-separación por cromatografía líquida acoplada a otra de gases con detector de ionización de llama (AECOSAN, 2017), y en ello se basa el único método europeo estandarizado para su determinación en algunos alimentos que sirve para determinar concentraciones por encima de 10 mg/kg pero cuyo valor depende de la matriz alimentaria y sobre todo de su contenido en grasa dando valores menos fiables cuanto mayor es el contenido en ella (DIN EN, 2017). Las especificaciones de los HAM suelen referirse a propiedades físico-químicas como la viscosidad, relacionadas con el uso al que se destinan. Productos con las mismas características pueden tener diferente composición química en función del origen del aceite y su procesado. Los HAM de grado técnico contienen normalmente 15-35 % de HAP y los de grado alimentario se someten a una destilación adicional para reducir al mínimo el contenido de HAP (EFSA 2012).

Solo se dispone de datos de presencia de HAM en un número limitado de grupos de alimentos, centrándose en el contenido de HSAM, sin diferenciar entre parafinas y naftenos, con un número de carbonos entre 12 y 40. No hay información disponible sobre los HAAM por lo que solo se puede hacer una estimación de su composición. En general, los niveles de HSAM son bajos en casi todos los grupos alimentarios, salvo en “panes y bollos” y “cereales para el consumo humano”, principalmente arroz con valores de 261 mg/kg y 132 mg/kg de media, respectivamente, los cuales, por el contrario, presentan niveles muy bajos de HAAM. El resto de grupos muestran valores medios significativamente más bajos: productos de confitería distintos de chocolate (46 mg/kg), aceites vegetales (41-45 mg/kg), productos de la pesca en conserva (40 mg/kg), semillas oleaginosas (38 mg/kg), grasas animales (22-24 mg/kg), carne de pescado (21 mg/kg), frutos de cáscara (20-21 mg/kg) y postres y helados (14 mg/kg) (EFSA, 2012). La presencia de ambas sustancias en alimentos secos puede atribuirse en parte al uso de papel reciclado.

El grupo de trabajo también revisó la migración de HAM en alimentos envasados con papel y cartón reciclados, encontrándose que cuando no se utilizan barreras funcionales (bolsas o recubrimientos que impidan la migración) existe una transferencia significativa hacia los alimentos por lo que deben realizarse análisis de migración y permeabilidad a lo largo del tiempo y considerar además que la migración desde el envase está influida por la temperatura y solo los HAM de hasta 25 carbonos migran a temperatura ambiente (FoodDrink Europe, 2018).

EFSA (2012) estima, considerando los valores medios encontrados en los distintos grupos de alimentos, que la exposición crónica media de la población europea está en el rango de 0,03-0,30 mg/kg p.c./día, y es más alta en consumidores jóvenes, en especial en edades de 3 a 10 años, que en adultos y ancianos. La migración procedente de los envases de papel reciclado podría contribuir significativamente a la exposición total, pero hay poca información al respecto.

La exposición de los consumidores a los HAAM procedentes de contaminación supone un 20 % de la exposición a los saturados HSAM, mientras que la aportación de los HAM de uso alimentario es mínima y la exposición a HAAM no se incrementa debido a este uso.

La preocupación potencial asociada al consumo de HAM, tanto HAAM como HSAM, puede ser de importancia en consumidores leales a una marca o que compran habitualmente el mismo producto en la misma tienda, por estar expuestos a altos niveles de HAM de forma regular.

Dada la complejidad de las mezclas que constituyen los HAM se deben acometer estudios adicionales tanto relacionados con técnicas analíticas como con la exposición humana y sus efectos reales sobre la salud para poder establecer recomendaciones y normativas. En este sentido Food-Drink Europe (2018) ha propuesto una serie de herramientas, considerando las tres posibles rutas de contaminación, que pretenden ayudar en la reducción del riesgo de contaminación por HAM implementando medidas en función de la ruta de entrada y el contaminante potencial.

### 2.4.3 Recomendaciones y consideraciones futuras

Los HAM pueden estar presentes en los alimentos tanto por contaminación ambiental, como por generarse o incorporarse durante su procesado, además de por migración desde los materiales de envase, en particular papel y cartón. Los posibles efectos de los distintos compuestos que constituyen los HAM sobre la salud humana varían considerablemente dependiendo de su estructura química. Por ello, de forma inmediata se debería disponer de patrones y materiales de referencia certificados de los componentes de los HAM para mejorar los métodos analíticos y los sistemas de supervisión para evaluar mejor los riesgos que plantean los HAM. Del mismo modo, en el futuro debería distinguirse entre HAAM y HSAM, y dentro de estos últimos en función de las estructuras químicas y el número de carbonos de la cadena, haciéndose necesarios más datos sobre la acción de HSAM multi-ramificados y cíclicos. Con respecto a los grupos de alimentos donde se encuentran, se deberían controlar los que contribuyen en mayor medida a la exposición y aquéllos en los que se utilizan aceites blancos. Se hace necesario identificar las fuentes de contaminación a lo largo de todas las etapas del proceso de producción de alimentos para diseñar sistemas de control adecuados.

La contaminación de alimentos con HAM debido al uso de cartón reciclado como material de embalaje se debe prevenir de forma eficaz incluyendo materiales que sirvan de barrera funcional en el envase. Del mismo modo, es preciso realizar estudios toxicológicos adicionales sobre los diversos peligros que plantean las distintas fracciones de HAM enfocada en el rango de pesos moleculares y subclases estructurales más que en propiedades fisicoquímicas, como la viscosidad. Se debería investigar si la exposición oral de los HSAM está asociada con enfermedades autoinmunes sistémicas o con una función inmune alterada, así como estudiar la transferencia a los seres humanos de los resultados de los estudios sobre los HAM en animales. Finalmente, EFSA, en su opinión científica de 2012, sugería la revisión del grupo de IDAs temporales para los aceites de baja y media viscosidad.

En 2017, la Comisión Europea ha publicado la Recomendación (EU) 2017/84, relativa a la vigilancia de HAM en alimentos y objetos destinados a entrar en contacto con ellos (UE, 2017). En esta recomendación se insta a vigilar a lo largo de 2017 y 2018, pudiendo presentarse los últimos datos antes

del 28 de febrero de 2019, la presencia de HAM en los siguientes alimentos: grasas animales, pan y productos de panadería fina, cereales para desayuno y artículos de confitería (incluido chocolate y cacao), carne de pescado y productos de pescado (pescado en conserva), cereales para consumo humano, helados y postres, semillas oleaginosas, pasta, productos derivados de cereales, legumbres, embutidos, frutos con cáscara y aceites vegetales, así como los materiales en contacto con los alimentos utilizados para dichos productos. Sin embargo, para una aplicación uniforme de la Recomendación y obtener resultados fiables, se deben seguir las directrices específicas del laboratorio de referencia de la UE, pero aún no existen dichas directrices y se insta a los Estados miembros a colaborar en la elaboración de las mismas.

## 2.5 Micotoxinas de *Claviceps*

### 2.5.1 Identificación y caracterización del peligro

Cornezuelo es el término utilizado para designar el micelio solidificado del hongo *Claviceps purpurea*, *africana*, *fusiformis*, *sorghii* y especies afines que pueden afectar a los pastos y cereales de todo tipo. Los principales tipos de cereales afectados son centeno, triticale (*Claviceps purpurea*), sorgo (*Claviceps africana sorghi*, *sorghicola*) y mijo perla (*Claviceps fusiformis*). Además, puede afectar a trigo y cebada en primaveras con periodos largos de humedad y frío.

El cornezuelo (esclerocio), una especie de “cuerno” de color oscuro (de ahí el nombre) y a veces blanco, que se forma en lugar del grano en las espigas de los cereales infectados a través de la inflorescencia de la planta. Si no se hace una buena selección de granos antes de moler, se mezcla con las harinas. La importancia de las buenas prácticas agrícolas y de procesado fue resaltada por la Comisión del *Codex Alimentarius* que en 2003 publicó un código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas y lo revisó en 2016 el CAC/RCP 51-2003 (Codex Alimentarius, 2016).

Los esclerocios contienen alcaloides tóxicos. Hay 40 alcaloides conocidos del cornezuelo, siendo ergometrina, ergotamina, ergosina, ergocristina, ergocriptina y ergocornina, y sus epímeros, los predominantes. En el cornezuelo del sorgo, además son importantes la dihidroergosina y alcaloides afines (Blaney et al., 2010). Los perfiles de distribución y concentración de alcaloides varían en función de la cepa de *Claviceps*, el huésped, las condiciones meteorológicas, pues la humedad facilita su proliferación, y la zona geográfica. Por tanto, el contenido de alcaloides en un esclerocio es variable pero puede llegar hasta el 0,5 % (Codex Alimentarius, 2016).

La intoxicación por contaminación de harinas por cornezuelo se conoce actualmente como ergotismo y antiguamente mal de los ardientes, fuego sagrado o fuego de San Antonio y ha dado lugar a graves intoxicaciones colectivas: estuvo muy presente en la Edad Media y actualmente, aunque ya no siguen produciéndose grandes epidemias en el ser humano, siguen produciéndose epidemias esporádicas locales en años más recientes y es frecuente en animales domésticos.

Hay dos formas sintomáticas de ergotismo: gangrenoso y convulsivo. En la forma gangrenosa, se percibe un efecto de hormigueo en los tejidos periféricos que conduce finalmente a la pérdida de extremidades, mientras que en su forma convulsiva, el hormigueo va seguido de alucinaciones, delirio y convulsiones de tipo epiléptico (Codex Alimentarius, 2016). Tras la ingestión de pequeñas

cantidades de alcaloides de cornezuelo, se producen síntomas agudos como vómito, espasmos, dolor de cabeza, problemas cardiovasculares y disfunciones del sistema nervioso central, así como contracciones de útero que dan lugar a sangrados y abortos. El consumo de altas concentraciones da lugar a efectos tóxicos agudos como trastornos circulatorios por vasoconstricción del músculo cardíaco, pero también en riñones y extremidades, acompañados de alucinaciones, espasmos, sensaciones disminuidas, parálisis, e incluso la muerte por paro cardíaco o respiratorio. La ingesta crónica de cantidades moderadas de esos alcaloides puede afectar a la reproducción (provocar abortos, causa de peso bajo al nacer y lactancia deficiente). Cuando la ingestión crónica es alta produce los síntomas que corresponden a la ingestión aguda de elevadas cantidades. Además, en determinados grupos de consumidores (niños pequeños y mujeres gestantes) puede haber efectos indeseables en su salud cuando consumen productos horneados y harinas que contienen alcaloides del cornezuelo (Mariné, 2012).

En el año 2000, la Comisión Europea estableció un límite de 0,05 % de esclerocios como requisito de calidad para los cereales en régimen de intervención y, basándose en datos toxicológicos, Suiza y Alemania, han considerado los límites de alcaloides totales de cornezuelo en centeno para consumo humano de 100 µg/kg y 400-500 µg/kg, respectivamente (Mariné, 2012).

La contaminación de alcaloides del cornezuelo es un problema de importancia en piensos pues el ganado bovino, ovino y las aves de corral son sensibles a las toxinas del cornezuelo del centeno. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2005) concluyó que no se podía establecer una relación entre cantidad de esclerocios y de alcaloides del cornezuelo, ya que la concentración de alcaloides en los esclerocios es muy variable (0,01-0,5 %), pero asumiendo una media de 0,2 %, un nivel de 0,05 % de esclerocio alcanza un contenido total de 1 000 µg/kg de alcaloides. En Estados Unidos y Canadá, el nivel máximo permisible de esclerocios en grano es de 300 mg/kg. En lo relativo a los piensos, Canadá y Uruguay han establecido límites que varían de 450 a 9 000 µg/kg, en función del animal (Mariné, 2012). Posteriormente, EFSA (2017) realizó un estudio en alimentos y piensos sobre la exposición a los 12 alcaloides principales del cornezuelo, ergometrina, ergosina, ergocornina, ergotamina, ergocristina, ergocryptina, los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$ , y sus correspondientes epímeros inina-S. Se encontró una relación lineal estadísticamente significativa entre el contenido de esclerocios y los niveles de alcaloides cuantificados en distintos granos de cereal (cebada, avena, centeno, triticale y trigo). Sin embargo, la ausencia de esclerocios no excluye la presencia de alcaloides en muestras donde no se identificaron esclerocios por tener contenidos por debajo de los límites de cuantificación, lo que serían falsos negativos.

El polvo del cornezuelo es muy fino y se adhiere con facilidad a la superficie de los granos, hecho que se debe tener en cuenta en las labores de limpieza en las que se deben retirar los cuerpos del cornezuelo y el polvo de la remesa de cereal en la mayor medida posible. Los procedimientos de limpieza del grano se deben adaptar para lograr una eficacia máxima e implementar un segundo proceso de limpieza para el grano previamente limpiado (Codex Alimentarius, 2016).

La toxicidad aguda del cornezuelo del centeno es relativamente baja. Las dosis mortales por polvo de esclerocios se cifran en 10-15 gramos. Considerando que una persona consume 300-400 g de pan al día, este tendría que contener un 3 % de cornezuelo aproximadamente, lo que sería

apreciable a simple vista en la harina, pues tendría manchas violetas, marronáceas o azules. Es más difícil de detectar y evaluar las consecuencias de un consumo reiterado de dosis bajas o muy bajas. Con respecto a las dosis farmacológicas por vía oral de los alcaloides, las indicaciones para la ergotamina están en 6 mg/día o 10 mg/semana. Hay que considerar que las grandes intoxicaciones históricas se debían a infestaciones importantes, a que no se controlaba la calidad del grano y a que la ingestión era reiterada. Por otra parte, si la ingestión es de los esclerocios sólidos, sólo se absorbe una parte de sus componentes y, además, la preparación de los cereales y sus derivados, como la panificación, inactiva, según algunos hasta el 50 %, la actividad de los alcaloides. Además, es conocido que los alcaloides del cornezuelo no presentan carcinogenicidad e incluso alguno presenta el efecto opuesto por lo que se ha investigado su uso como agentes citostáticos, aunque no queda claro si la exposición a esos alcaloides en la dieta tiene capacidad para mitigar los efectos carcinógenos (De Ruyck et al., 2015).

### 2.5.2 Evaluación de la exposición y riesgos potenciales

EFSA (2012) evaluó los datos disponibles sobre presencia y eventuales efectos de los alcaloides del cornezuelo en alimentos y piensos en la Unión Europea y, considerando que es tolerable una ingesta diaria de 0,6 µg/kg p.c./día y 1 µg/kg p.c./día para la dosis de referencia aguda del grupo de alcaloides totales de cornezuelo del centeno (la toxicidad de los principales alcaloides se considera bastante parecida), concluyó que los datos existentes no implican riesgo para ningún subgrupo de población humana. Posteriormente, evaluó un número mucho mayor de muestras, especialmente de alimentos procesados obteniendo resultados similares (EFSA, 2017). En ambas evaluaciones se mencionó que la primera infancia es una etapa de mayor riesgo de ingestión con una exposición aguda estimada de 0,02 µg/kg p.c./día en bebés y de 0,32 µg/kg p.c./día en niños mayores. No hay un riesgo mayor en las personas vegetarianas. Los alimentos en los que se había detectado más presencia de alcaloides son el centeno y derivados, aunque sin descartar que pueda haber otras fuentes de contaminación no estudiadas hasta el momento. Uno de los productos recientemente evaluados ha sido la cebada y su derivado, la cerveza, donde se observó cómo las concentraciones iniciales de alcaloides en la cebada se reducían a lo largo del proceso hasta quedar en niveles muy reducidos en el producto final (<10 µg/l), por lo que la cerveza no puede considerarse como una fuente de alcaloides de cornezuelo en la dieta (Bauer et al., 2016).

Con respecto al ganado, EFSA (2012, 2017) indicó que en condiciones normales el riesgo de toxicosis es bajo, siendo los cerdos para engorde los de mayor nivel de exposición, pero que hay más posibilidades de ingerir dosis significativas de los alcaloides en las personas.

En las evaluaciones del Instituto Alemán de Evaluación de Riesgos (BfR), se puso de manifiesto el riesgo potencial para los consumidores de porciones grandes de productos a base de cereales contaminados con niveles superiores a 64 µg de alcaloides del cornezuelo por kg de producto y se considera que el contenido de alcaloides de cornezuelo permanece constante durante la elaboración (Fajardo et al., 2012). Ello indica que el nivel de 64 µg/kg es razonable si la cantidad inicial de alcaloides del cornezuelo presente en los cereales o harinas es baja, situada entre 100 y 250 µg/kg en función de la receta del producto.

La Comisión Europea estableció un nivel máximo de 0,5 g de esclerocios del cornezuelo en un kg de cereales sin elaborar, comercializados para una primera fase de transformación de los cereales, con excepción del maíz y el arroz (UE, 2015). El nivel máximo se podría ampliar en el futuro, cuando se hayan reunido más datos sobre el contenido de alcaloides de cornezuelo en cereales elaborados, donde los esclerocios del cornezuelo no son visibles.

En la determinación analítica de los alcaloides del cornezuelo, cabe destacar la existencia de varios compuestos de referencia de los alcaloides y su alta inestabilidad. Este hecho junto con la preparación de muestra en ausencia de luz para evitar la formación de compuestos derivados de su acción, deben ser tenidos rigurosamente en cuenta durante las distintas etapas de su análisis. Hay diversas técnicas analíticas que pueden utilizarse, desde métodos espectroscópicos, los más antiguos, hasta la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a detector de masas, pasando por la inmunología y la cromatografía de gases y existe un método de HPLC con detector de fluorescencia validado internacionalmente (EFSA, 2012 y 2017).

### 2.5.3 Recomendaciones y consideraciones futuras

La ausencia real de un peligro tiene que estar muy demostrada para dejar de considerarlo en la legislación alimentaria. En el caso de los alcaloides del cornezuelo, no parece que haya un problema importante si se siguen las recomendaciones de cultivo y almacenamiento, pero sí que es necesario estudiarlo y hacer un seguimiento pues podría ser que ciertas prácticas agrícolas pudieran comportar algún riesgo si no se toman las precauciones adecuadas. Parece bastante evidente que, aunque el riesgo en la práctica es bajo, hay que incluir el seguimiento y el control de la presencia de alcaloides del cornezuelo en alimentos y piensos, de la misma manera que se hace con otras micotoxinas.

Según la Comisión Europea hay que disponer de más datos de presencia de alcaloides de cornezuelo en piensos y alimentos, especialmente los procesados, y utilizar métodos analíticos con suficiente sensibilidad para detectarlos y cuantificarlos y así poder relacionar la cantidad de esclerocios de la planta con la concentración de alcaloides. Se podría considerar otro plan de muestreo y un método diferente para evaluar el nivel de contaminación y tener en cuenta que el polvo del cornezuelo también puede contaminar el cereal sin que sea visible.

Los cuerpos del cornezuelo y su polvo fino adherido a la superficie de los granos y en el surco tienen que evitarse y retirarse de la cadena de elaboración. La prevención de la contaminación con alcaloides de cornezuelo no queda totalmente cubierta por las disposiciones generales del Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas (CAC/RCP 51-2003) por lo que se hace necesario un anejo específico para tratar los puntos no incluidos en las disposiciones generales.

## 2.6 Toxinas de *Alternaria*

### 2.6.1 Identificación y caracterización del peligro

El género *Alternaria* fue definido originalmente en 1816 y desde entonces se han descrito numerosas especies de *Alternaria* sp. El género produce más de 70 micotoxinas, siendo las más importan-

tes el alternariol (AOH), alternariol monometiléter (AME), altenueno (ALT), ácido tenazónico (TeA), tentoxina (TEN), toxinas de *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici* (toxinas AAL) y las altertoxinas (ATX) I, II, III (ATX-I, -II, -III). Entre las principales especies productoras de micotoxinas se incluyen: *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. brassicae*, *A. brassiciola*, *A. citri*, *A. cucumerina*, *A. dauci*, *A. gaisen*, *A. jaoinica*, *A. kikuchiana*, *A. longipes*, *A. mali*, *A. pori*, *A. racina*, *A. radicina*, *A. solani*, *A. tenuissima* (Tabla 1).

| <b>Tabla 1.</b> Especies productoras de micotoxinas de <i>Alternaria</i> y alimentos que contaminan |   |   |
|---|---|---|
| <b>Micotoxina</b>   | <b>Especie productora</b>   | <b>Alimentos implicados</b>   |
| Ácido tenuazónico (TeA)   | <i>A. alternata</i> , <i>A. brassicae</i> , <i>A. brassiciola</i> , <i>A. citri</i> , <i>A. jaoinica</i> , <i>A. kikuchiana</i> , <i>A. mali</i> , <i>A. pori</i> , <i>A. racina</i> , <i>A. tenuissima</i>   | Aceitunas, frutas cítricas, manzanas y zumo, pimienta, semillas de girasol, sorgo, tomate, trigo, especias, naranja, limón, remolacha roja, bebidas alcohólicas, hortalizas y derivados, alimentos infantiles                             |
| Altertoxina I-II-II (ATX)   | <i>A. alternata</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. brassicae</i> , <i>A. gaisen</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. mali</i> , <i>A. radicina</i> , <i>A. tenuissima</i>  | Manzana y zumo, sorgo   |
| Alternariol (AOH)   | <i>A. alternata</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. brassicicola</i> , <i>A. citri</i> , <i>A. cucumerina</i> , <i>A. dauci</i> , <i>A. gaisen</i> , <i>A. tenuissima</i>   | Avena, pimienta, tomate, manzana y zumo, especias, semillas de girasol, naranja, limón, trigo, legumbres, bebidas alcohólicas, hortalizas y derivados   |
| Alternariol monometiléter (AME)   | <i>A. alternata</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. brassicae</i> , <i>A. brassicicola</i> , <i>A. citri</i> , <i>A. cucumerina</i> , <i>A. dauci</i> , <i>A. gaisen</i> , <i>A. kikuchiana</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. mali</i> , <i>A. porri</i> , <i>A. solani</i> , <i>A. tenuissima</i> | Aceitunas, cebada, centeno, frutas cítricas, manzana y zumo, melón, hortalizas y derivados, pimienta, bebidas alcohólicas, semillas de girasol, sorgo, tomate, legumbres, trigo, pimienta, especias, naranja, limón, alimentos infantiles |
| Altenueno (ALT)   | <i>A. alternata</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. citri</i> , <i>A. gaisen</i> , <i>A. porri</i> , <i>A. tenuissima</i>   | Granos de cereales y derivados, semillas de oleaginosas, aceites de semillas, hortalizas y derivados  |
| Tentoxina (TEN)   | <i>A. alternata</i> , <i>A. mali</i> , <i>A. porri</i> , <i>A. tenuissima</i>   | Granos de cereales y derivados, aceites de semillas, hortalizas y derivados   |
| ALL-toxina  | <i>A. alternata</i>   | Granos de cereales y derivados  |

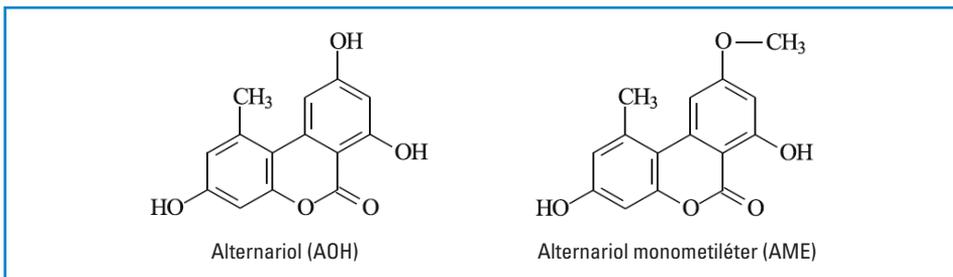
**Fuente:** (Soriano, 2007) (Barkai-Golan, 2008) (Ostry, 2008) (Barros et al., 2011) (Pavón et al., 2012).

Las temperaturas de crecimiento óptimas para el género *Alternaria* oscilan entre 22 y 30 °C, aunque puede crecer y producir micotoxinas entre 0 y 6,5 °C en las regiones más frías y con baja actividad de agua. El género *Alternaria* deteriora alimentos durante el transporte y el almacenamiento, incluso en alimentos refrigerados por debajo de la temperatura marcada. Por este motivo, las mico-

toxinas de *Alternaria* se encuentran con frecuencia en una gran variedad de productos vegetales frescos y procesados (Tabla 1).

La presencia de micotoxinas de *Alternaria* en alimentos es probable en las condiciones óptimas de crecimiento (Soriano, 2007) (Barkai-Golan, 2008) (Ostry, 2008) (Barros et al., 2011) (Pavón et al., 2012). El consumo humano directo de alimentos infectados de forma visible con hongos es improbable en humanos. Los alimentos más probablemente contaminados con micotoxinas de *Alternaria* son frutas y verduras (Tabla 1). Sin embargo, es frecuente encontrarlas en alimentos procesados como salsas de tomate, conservas, mermeladas, vino o zumos de fruta (Fernández-Cruz et al., 2010). La presencia de micotoxinas de *Alternaria* en cereales es muy común debido al almacenamiento de los granos en condiciones favorables para el crecimiento del hongo (Logrieco et al., 2003). También, se ha detectado la presencia de AME y TeA en preparados infantiles que contenían cereales en su composición (Scoot et al., 2012). En semillas oleaginosas como la colza, el girasol, el sésamo y la linaza se ha determinado la presencia de AOH y AME (Visconti et al., 1986) (Ostry et al., 2004) (Ostry, 2008), al igual que en legumbres como las lentejas y la soja (Barkai-Golan, 2008) (Barros et al., 2011).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el AME posee una mala absorción en el tracto gastrointestinal; no obstante, la proporción absorbida se metaboliza y persiste en los tejidos (Pollock et al., 1982) (Pfeiffer et al., 2007). El AOH y el AME producen metabolitos hidroxilados, principalmente catecoles, a través del citocromo P-450. La importancia de los catecoles radica en su capacidad para formar intermediarios reactivos tales como quinonas y semiquinonas que son capaces de producir especies reactivas del oxígeno (ROS) e unirse al ADN dando lugar a aductos de ADN (Solhaug et al., 2012). El AOH y el AME (Figura 2) tienen 3 y 2 grupos hidroxilo fenólicos respectivamente, que reaccionan con el ácido uridíndifosfato glucurónico (UDPGA), mediante enzimas uridínglucuronil-transferasas (UGTs), microsomas intestinales y hepáticas formando conjugados glucurónidos tales como AOH-3-O-glucurónido, AOH-9-O-glucurónido y AME-3-O-glucurónido (Pfeiffer et al., 2009). Ambas micotoxinas de *Alternaria* se glucuronidan fácilmente en tejidos hepáticos y extra hepáticos. Estas micotoxinas además pueden formar conjugados sulfatados mediante sulfotransferasas y por biometilación compuestos O- metilados (Pfeiffer et al., 2007) (Burkhardt et al., 2009, 2011). Por tanto, aunque el AOH no se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal, una vez biotransformado en hígado y excretado vía biliar al duodeno, se absorbe rápidamente desde el lumen intestinal y alcanza la sangre portal en forma de aglicona, glucurónido y sulfato (Burkhardt et al., 2011).



**Figura 2.** Estructura química del alternariol y alternariol monometiléter

Los metabolitos de *Alternaria* exhiben diferentes actividades biológicas tales como propiedades antimicrobianas, fitotóxicas y citotóxicas. Por ejemplo, la porritoxina de la especie endofítica de *Alternaria porri* se ha estudiado como agente quimioprotector del cáncer (Horiuchi et al., 2006). La depudecina es un metabolito de la especie *A. brassicicola*, inhibidor de la histonadeacetilasa (HDAC), que presenta un potencial antitumoral (Kwon et al., 2003). Por otra parte, el TeA y la TEN se han estudiado como posibles herbicidas (Lou et al., 2013).

Se dispone de escasos estudios de toxicidad aguda y crónica experimentales en especies animales. Como se observa en la tabla 2, los animales de experimentación o embriones se exponen a extractos crudos de hongos de *Alternaria* o micotoxinas tales como AOH, AME, mezcla de AOH+AME, ALT, ATX-I, ATX-II y TeA por diferentes vías de administración, oral, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea (Tabla 2). De todos los estudios de toxicidad aguda realizados, únicamente la TeA mostró valor de DL<sub>50</sub> en pollos de 1 día y en ratones, variando entre 37,5 a 225 mg/kg p.c./día. En la tabla 2, también se observan algunos efectos de toxicidad crónica obtenidos tras la exposición de animales de experimentación a diferentes dosis de micotoxinas de *Alternaria*.

Estudios *in vitro* evidencian que algunas micotoxinas de *Alternaria* provocan genotoxicidad en bacterias y células de mamíferos (Tiessen et al., 2013), efectos clastogénicos y de inducción de rotura del ADN en diferentes células de mamíferos (Lehmann et al., 2006) (Wollenhaupt et al., 2008) (Fehr et al., 2009).

En humanos se ha observado que en personas inmunodeficientes (transplantados o enfermos de Cushing) causan infecciones oportunistas, alternariosis cutánea (placas pardorrojizas papulonodulares, pustulosas o ulcerocostrosas localizadas (Schracher et al., 2001) (Vieira et al., 2006). Igualmente se relaciona con rinosinusitis, oculomicosis, y onicomycosis (Pastor y Guarro, 2008). Como en el caso de otros hongos en algunos pacientes la exposición a esporas o sus micotoxinas en el contexto del síndrome de hipersensibilidad a moho y humedad (dampness and mold hypersensitivity syndrome) puede producir síntomas del espectro inflamatorio, reumatológico o neurológico (Valtonen, 2017).

Por otro lado, el género *Alternaria* causa reacciones de rinoconjuntivitis y asma mediadas por IgE (de Vouge et al., 1998) (Päivi et al., 2006). La especie *A. alternata* se considera un potente alérgeno, ya que se asocia a asma bronquial severo y es uno de los hongos que más sensibilización produce en pacientes alérgicos. Sin embargo, las reacciones alérgicas por ingesta de alimentos y atribuido a contaminación por hongos es extremadamente rara (Bobolea et al., 2009).

Con los datos disponibles actualmente, no se puede establecer una asociación entre micotoxinas de *Alternaria* y elevada incidencia de cáncer de esófago en humanos debido a múltiples factores limitantes como son la presencia en las mismas muestras de concentraciones elevadas de otros compuestos carcinógenos, sesgo de datos, etc., no considerados en dichos estudios (Liu et al., 1991, 1992) (Yekeler et al., 2001) (EFSA 2011).

**Tabla 2.** Efectos tóxicos de las micotoxinas de *Alternaria* mediante ensayos *in vivo*

| Especie     | Micotoxina | Vía y dosis  | Tipo de ensayo                                  | Efectos   | Referencia   |                     |
|-------------|------------|--|---|---|--|---------------------|
| Ratón       | AOH, AME   | <i>i.p.</i> 100,200, 400 mg/kg p.c.<br>AOH+AME (100+100) mg/kg p.c.                                    | Toxicidad aguda                                 | Espasmos gástricos  | Pero et al. (1973)   |                     |
|             | AOH        | <i>s.c.</i> 100 mg/kg p.c. día<br>Administración a 9-12 días de la gestación y a 13-16 de la gestación | Reproducción y desarrollo                       | Aumento de muertes.<br>Reabsorción parcial o total del feto   |  |                     |
|             | AOH        | 200 y 1 000 mg/kg p.c. (AOH radiomarcado)  | Toxicocinética                                  | Baja absorción sistémica, 90 % de la dosis total se excreta por las heces y hasta 9 % a través de la orina. Niveles significativos en sangre (0,5 µM) | Schuchardt et al. (2014)   |                     |
|             |            | 3 x 2 000 mg/kg (0, 24, y 45 horas), tras 48 horas los ratones se sacrifican                           | Genotoxicidad. Ensayos de micronúcleos y cometa | No se observó efecto genotóxico en médula ósea ni en tejido hepático  |  |                     |
|             | AME        | Alimento: 50 mg/kg p.c. 10 meses   | Carcinogenicidad                                | Displasia de la mucosa esofágica  | Yekeler et al. (2001)  |                     |
|             | ALT        | <i>i.p.</i> 50 mg/kg p.c. (hembras)  |   | Muertes: 1/3  | Pero et al. (1973)   |                     |
|             | ATX-I      | <i>i.p.</i> 100 y 200 mg/kg p.c. (hembras)   |   | Muertes: 0/8 (100 mg/kg p.c.); 8/8 (200 mg/kg p.c.)   |  |                     |
|             | ATX-II     | <i>i.p.</i> 100 y 200 mg/kg p.c. (hembras)   |   | Muertes: 0/2 (100 mg/kg p.c.) 2/2 (100 mg/kg p.c.)  |  |                     |
|             | TeA        | Sal sódica <i>i.v.</i>   |   | Toxicidad aguda   | DL <sub>50</sub> = 162 (machos); DL <sub>50</sub> = 115 (hembras)                      | Smith et al. (1968) |
|             |            | Sal sódica oral  |   |   | DL <sub>50</sub> = 186 mg/kg p.c. (machos); DL <sub>50</sub> = 81 mg/kg p.c. (hembras) |                     |
| <i>i.v.</i> |            | DL <sub>50</sub> = 125 mg/kg p.c. (machos)   |   |   | Woodey y Chu (1992)  |                     |
| <i>i.p.</i> |            | DL <sub>50</sub> = 150 mg/kg p.c. (machos)   |   |   |  |                     |
| <i>s.c.</i> |            | DL <sub>50</sub> = 145 mg/kg p.c. (machos)   |   |   |  |                     |
| Oral        |            | DL <sub>50</sub> = 225 mg/kg p.c. (machos)   |   |   |  |                     |

**Tabla 2.** Efectos tóxicos de las micotoxinas de *Alternaria* mediante ensayos *in vivo*

| Especie                | Micotoxina | Vía y dosis   | Tipo de ensayo            | Efectos   | Referencia              |
|------------------------|------------|---|---------------------------|---|-------------------------|
| Rata                   | AME, AOH   | AOH: 21 días con 39 mg/kg y día AME: 21 días con 24 mg/kg y día | Toxicidad crónica         | No hay evidencia de toxicidad   | Sauer et al. (1978)     |
|                        | TeA        | Sal sódica <i>i.v.</i>  | Toxicidad aguda           | DL <sub>50</sub> = 146 mg/kg p.c. (machos); DL <sub>50</sub> = 157 mg/kg p.c. (hembras) | Smith et al. (1968)     |
|                        |            | Sal sódica oral   |                           | DL <sub>50</sub> = 180 mg/kg p.c. (machos); DL <sub>50</sub> = 168 mg/kg p.c. (hembras) |                         |
| Hamster                | AME        | <i>i.p.</i> 200 mg/kg p.c. el día 8 de la gestación             | Reproducción y desarrollo | Dosis tóxicas para la madre. Aumento de reabsorciones y disminución del peso del feto   | Pollock et al. (1982)   |
| Pollo de 1 día de vida | TeA        | Oral  | Toxicidad aguda           | DL <sub>50</sub> = 37,5 mg/kg p.c.  | Giambrone et al. (1978) |
| Embrión de pollo       | AME, AOH   | <i>i.p.</i> 1 000 (AOH), 500 (AME) µg por huevo                 |                           | No mortalidad   | Griffin y Chu (1983)    |
|                        | TeA        | 10 µg/ml de TeA   |                           | DL <sub>50</sub> = 0,548 mg/huevo   |                         |

Abreviaturas: AOH: alternariol; AME: alternariol monometil éter; TeA: ácido tenazoico; *i.p.*: intraperitoneal; *sc.*: subcutánea; p.c.: peso corporal.

## 2.6.2 Evaluación de la exposición y caracterización del riesgo

Las mayores concentraciones de micotoxinas de *Alternaria* encontradas en alimentos según EFSA se detallan a continuación (EFSA, 2016). Para el tratamiento de los datos en los que no se detecta micotoxina, se sigue (según recomienda EFSA, 2010) la guía que sugiere el enfoque del límite inferior (LB) donde los valores por debajo del límite de cuantificación (LOQ) y el límite de detección (LOD) se reemplazan por cero y para el límite superior (UB) los valores por debajo del LOD se reemplazan por el LOD y aquellos por debajo del LOQ se reemplazan por el valor del LOQ. Así, las concentraciones más altas de AOH se han encontrado en castañas (LB= 43,9 µg/kg, UB= 44,5 µg/kg), seguidas de avena (LB= 35,3 µg/kg, UB= 39,7 µg/kg), trigo sarraceno (LB= 27,9 µg/kg, UB= 33,1 µg/kg) y semillas de girasol (LB= 22,4 µg/kg, UB= 29,1 µg/kg). En el caso del AME, las mayores concentraciones se encontraron en castañas (LB= 16,8 µg/kg, UB= 17,5 µg/kg), seguidas de semillas de sésamo (LB= 11,3 µg/kg, UB= 11,8 µg/kg), trigo sarraceno (LB= 10,1 µg/kg, UB= 11,0 µg/kg) y avena (LB= 6,4 µg/kg, UB= 7,1 µg/kg). Respeto al TEN, las semillas de girasol presentaron las concentraciones más altas (LB= 79,0 µg/kg, UB= 82,0 µg/kg). Para el TeA todos los alimentos analizados contenían concentraciones muy superiores al resto de micotoxinas de *Alternaria* analizadas. Las concentraciones más eleva-

das se obtuvieron en pimentón en polvo (LB= 8 801,0 µg/kg, UB= 8 802,0 µg/kg) y moras (LB= UB= 5 742,0 µg/kg). El resto de alimentos contenían concentraciones de TeA muy superiores a las concentraciones en alimentos del AOH y AME. Por poner algún ejemplo, las castañas contenían niveles de TeA de 793,0 µg/kg (LB) y 794 µg/kg (UB) y las semillas de girasol 563,0 µg/kg (LB) y 570 µg/kg (UB).

Actualmente no hay legislación sobre toxinas de *Alternaria* en alimentos ni en piensos en Europa o en otras regiones del mundo. EFSA considera las siguientes micotoxinas AOH, AME, TeA, iso-TaA, ATX, TEN, ALT y toxinas AAL (por su mayor presencia en alimentos y piensos) para llevar a cabo la evaluación de riesgos en alimentos y piensos (EFSA 2011, 2016). Debido a los pocos datos de toxicidad disponibles de las micotoxinas de *Alternaria*, el Panel CONTAM de EFSA utiliza el concepto de umbral de preocupación toxicológica (*Threshold of Toxicological Concern*, TTC) para evaluar el nivel relativo de preocupación de estas micotoxinas para la salud humana. El Panel concluyó que para las toxinas genotóxicas de *Alternaria* (AOH y AME), las exposiciones dietéticas crónicas medias estimadas en el límite superior (UB) y las exposiciones dietéticas del percentil 95 excedían el valor TTC (2,5 ng/kg p.c./día). Esto indica la necesidad de datos adicionales de toxicidad específica del compuesto ya que suponen un riesgo para la salud. Para las toxinas de *Alternaria* no genotóxicas por el test de mutagenicidad en bacterias (TeA y TEN con un valor de TTC de 1 500 ng/kg p.c./día), las estimaciones de exposición probablemente no sean un problema de salud humana considerando las concentraciones encontradas en los alimentos evaluados (EFSA, 2016).

EFSA ha determinado los niveles de exposición diarios de las micotoxinas de *Alternaria* para distintos grupos de población (Tabla 3) (EFSA, 2011). En la estimación de la exposición crónica a esta micotoxinas se consideran únicamente alimentos de origen vegetal, puesto que no se ha demostrado la presencia de micotoxinas de *Alternaria* en alimentos de origen animal (EFSA, 2011, 2016). Los alimentos incluidos en dicho estudio fueron: granos y productos a base de granos, vegetales y productos a base de vegetales (principalmente tomate), frutas y productos a base de frutas incluyendo zumos de frutas y vegetales, cerveza, vino, aceite de semillas y aceites vegetales (principalmente aceite de girasol y semillas de girasol). La exposición crónica a través de la dieta se calcula únicamente para dos grupos de edad, niños y adultos.

En la tabla 3 se muestra la exposición dietética media (consumo promedio en la población) y la exposición dietética alta (consumo de alimentos en el percentil 95 en la población) a micotoxinas de *Alternaria* según los informes de EFSA (2011, 2016). La exposición se calculó por separado para cada encuesta dietética utilizando datos de consumo a nivel individual. Los datos de consumo de alimentos individuales se combinaron con los valores medios de presencia de micotoxinas en el alimento para proporcionar las estimaciones de exposición. Las estimaciones de exposición se calcularon para ambos escenarios, LB (límite inferior) y UB (límite superior). Hay que destacar que en el informe se nombra que hay muchas muestras donde no se detectan micotoxinas de *Alternaria*, al estar por debajo del límite de detección o del límite de cuantificación. Como se muestra en la tabla 3, la comparación demuestra que el mayor consumo de alimentos por kg de peso corporal en niños supone una exposición dietética mayor en comparación con los adultos (factor de 2 a 3).

**Tabla 3.** Estimación de la exposición crónica a alternariol (AOH), alternariol monometiléter (AME), ácido tenazónico (TeA) y tentoxina (TEN) a través de la ingesta en adultos y niños

| Micotoxina | Exposición media a través de la dieta<br>(ng/kg p.c./día) |                     | Percentil 95 %<br>(ng/kg) |                     |
|------------|---|---------------------|---------------------------|---------------------|
|            | Niños<br>(LB-UB)*   | Adultos<br>(LB-UB)* | Niños<br>(LB-UB)*         | Adultos<br>(LB-UB)* |
| AOH        | 3,8-71,6  | 1,9-39,0            | 11,4-270,5                | 5,9-82,0            |
| AME        | 3,4-38,8  | 0,8-4,7             | 10,3-97,3                 | 3,1-15,0            |
| TeA        | 100,0-1 614,0   | 36,0-141,0          | 209,0-1 216,0             | 89,0-362,0          |
| TEN        | 1,6-33,4  | 0,01-7,0            | 4,9-54,4                  | 0,0-13,0            |

\*Niños (12-36 meses), adultos (18-65 años); LB (*lower bound*): límite inferior; UB (*upper bound*): límite superior. **Fuente:** (EFSA, 2016).

Debido a la presencia de estas micotoxinas principalmente en alimentos vegetales, los vegetarianos pueden estar más expuestos a estas toxinas debido a la mayor ingesta de alimentos de origen vegetal. No se dispone de muchos datos de consumo, pero considerando encuestas dietéticas con sujetos vegetarianos, como se muestra en la tabla 4, el informe de EFSA demuestra que la exposición crónica a las cuatro micotoxinas de *Alternaria* (AOH, AME, TeA y TEN) a través de la ingesta es mayor en los vegetarianos que en la población general (EFSA, 2016). No obstante, debido al tamaño muestral, esta conclusión debe interpretarse con cautela.

**Tabla 4.** Comparación de la exposición a alternariol (AOH), alternariol monometiléter (AME), ácido tenazónico (TeA) y tentoxina (TEN) en vegetarianos adultos y población adulta total de una encuesta dietética seleccionada (Encuesta Nacional de Nutrición II, Alemania)

| Micotoxina | Exposición media a través de la dieta<br>(ng/kg p.c./día) |                             | Percentil 95 %<br>(ng/kg) |                             |
|------------|---|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
|            | Vegetarianos<br>(LB-UB)*                                  | Población total<br>(LB-UB)* | Vegetarianos<br>(LB-UB)*  | Población total<br>(LB-UB)* |
| AOH        | 3,5-14,4  | 2,1-8,9                     | 11,3-45,5                 | 7,8-31,8                    |
| AME        | 1,8-10,3  | 1,1-7,4                     | 8,1-29,8                  | 4,2-19,7                    |
| TeA        | 127,0-227,0   | 87,0-186,0                  | 442,0-592,0               | 263,0-403,0                 |
| TEN        | 1,6-5,2   | 0,8-3,3                     | 4,5-12,4                  | 3,3-10,7                    |

\*Vegetarianos (n= 237), población total (n= 10 419); LB (*lower bound*): límite inferior; UB (*upper bound*): límite superior. **Fuente:** (EFSA, 2016).

### 2.6.3 Estrategias de mitigación de micotoxinas

Las estrategias previas y posteriores a la cosecha se utilizan para tratar de eliminar las micotoxinas en los alimentos y los piensos y prevenir sus efectos adversos sobre la salud de los seres humanos y animales. Evitar la formación de micotoxinas en el campo sería el mejor método de prevención, pero a menudo no es suficiente y se deben emplear otros métodos. Las estrategias de prevención durante el cultivo y el almacenamiento tienen como objetivo la selección de variedades de cultivos que puedan resistir el ataque de hongos; evitar temperaturas favorables para el desarrollo de los hongos; evita que la floración coincida con la liberación de esporas; utilizar técnicas de cultivo adecuadas para reducir el riesgo de contaminación por hongos; evitar el ataque de insectos; uso de técnicas de biocontrol; controlar el contenido de humedad y la concentración de oxígeno durante el almacenamiento; etc. Sin embargo, muchas veces estas medidas no se siguen correctamente o no producen cultivos libres de micotoxinas. En estos casos, es necesaria una etapa de descontaminación o degradación de las micotoxinas transformándolas en metabolitos menos tóxicos.

Entre los métodos para reducir o eliminar la presencia de las micotoxinas en los alimentos se incluyen la reducción química mediante el uso de sustancias químicas durante el procesamiento de alimentos, el uso de técnicas durante el tratamiento del alimento y la reducción de la bioaccesibilidad de las micotoxinas una vez absorbidas.

En la reducción química se usan sustancias que han demostrado ser eficaces para transformar las micotoxinas en metabolitos menos tóxicos o inactivarlos completamente. Entre estos compuestos se incluyen los isotiocianatos (ITC), compuestos reactivos naturales antimicrobianos que inhiben el crecimiento del hongo (Azaiez et al., 2013) (Nazareth et al., 2016).

Aunque las micotoxinas son compuestos estables, algunos tratamientos alimentarios como limpieza, molienda, fermentación con levaduras (cerveza, panificación), cocción, horneado, fritura, asado, enlatado, descascarillado, etc. pueden afectar la estructura química de algunas de ellas y reducir su toxicidad (Bretz et al., 2006) (Meca et al., 2012a, 2013a, b).

Y por último, se ha comprobado la reducción de la bioaccesibilidad de las micotoxinas en el tracto gastrointestinal mediante el empleo de cepas probióticas (*Lactobacillus animalis*, *Lb. Casei*, *Lb. Casei*, *Lb. Plantarum*, *Lb. Ruminis*, *Lb. Casei casei*, *Bifidobacterium breve*, *Bf. Adolescents*, *Bf. Bifidum*, *Corynebacterium vitaeruminis*, *Streptococcus faecalis*, *Eubacterium crispatus* y *Saccharomyces cerevisiae*). Los probióticos se emplean porque el ácido láctico que producen las bacterias se considera un agente detoxicante en el tracto gastrointestinal. Los mayor efectividad se ha obtenido con cepas de *Lactobacillus rhamnosus* (Meca et al., 2012b). Otros sistemas de reducción de la bioaccesibilidad son el empleo de los prebióticos celulosa e inulina, de las fibras dietéticas como galactomanano, glucomanano, fibra de cítricos, fibra de bambú, fibra de zanahoria, fibra de pastel, beta-glucan, xilan, y celulosa; y de los ingredientes de proteínas como el suero de leche, beta-lactoglobulina y caseinato de calcio (Luz et al., 2017).

### 2.6.4 Conclusiones y consideraciones futuras

Se encontraron micotoxinas de *Alternaria* (AOH, AME, TeA y TEN) en ciertos granos y productos a base de granos, tomate y productos de tomate, semillas de girasol y aceite de girasol, frutas, zumos

y productos de frutas, en cerveza y vino. La TeA fue la micotoxina de *Alternaria* con concentraciones más altas encontradas en productos a base de tomate, frutos secos, semillas oleaginosas, granos y frutas.

La mayor exposición a través de la dieta se estimó en vegetarianos y en niños debido principalmente a una mayor exposición a “alimentos a base de cereales para bebés y niños pequeños”.

Se necesita más información sobre la toxicocinética, incluido el metabolismo de las micotoxinas de *Alternaria* con mayor relevancia toxicológica, así como datos de toxicidad crónica, los cuales escasean en la mayoría de las micotoxinas de *Alternaria*.

Es necesario generar más datos analíticos sobre toxinas de *Alternaria* en productos alimenticios relevantes (por ejemplo, frutas y productos de frutas, tomates y productos a base de tomate, alimentos a base de cereales para bebés y niños pequeños, entre otros) y desarrollar métodos analíticos más sensibles que permitan reducir la incertidumbre asociada a la exposición a las diferentes toxinas de *Alternaria*.

## 2.7 Micotoxinas de *Fusarium* (Eniáticas, Nivalenol)

### 2.7.1 Identificación y caracterización del peligro

Las micotoxinas emergentes de *Fusarium* tales como eniáticas (Ens) y nivalenol (NIV) están ganando interés debido a que no están aún reguladas y/o por su aparición concomitante con otras micotoxinas (EFSA, 2014b, 2017) (Moretti et al., 2018). Las Ens pueden estar presentes en cantidades significativas en granos tales como trigo infectado con *F. avenaceum*. El NV se encuentra en trigo, maíz, cebada, avena y arroz infectados con *F. crookwellence* o *F. poae* principalmente, en condiciones determinadas de humedad y temperatura (EFSA, 2013, 2014b). Las Ens, de entre las de mayor prevalencia de estas toxinas, suelen encontrarse junto a bauvericina, deoxinivalenol, moniliformina y fumonisinas (Meca et al., 2010) (Svingen et al., 2017).

#### 2.7.1.1 Estructura química

Las Ens son un grupo amplio de hexadepsipéptidos cíclicos estructuralmente relacionados que consisten en tres residuos alternativamente unidos de ácido D22-hidroxicarboxílico y N-metilaminoácidos. Hasta el momento se han identificado 29 análogos naturales, pero sólo 4 de ellos, Eniatina A, A1, B y B1 han sido detectados de forma frecuente en alimentos (EFSA, 2014b). Debido a sus propiedades apolares las Ens pueden incorporarse en las membranas celulares y crear canales selectivos de cationes (Svingen et al., 2017). La más representativa en exposición humana es la EN-B (Maranghi et al., 2018).

El NIV es un tricoteceno tipo B, sesquiterpenoide tetracíclico con un grupo ceto en la posición 8. La fusarenona-X (FUS-X, 4-acetilnivalenol) es un precursor del NIV y los únicos productos de biotransformación identificados hasta el momento son el metabolito de fase I de-epoxi-nivalenol (DE-NIV) y el metabolito de fase II nivalenol-3-glucósido (NIV3Glc). Sin embargo, se espera que se formen otros metabolitos conjugados en plantas y hongos (EFSA, 2017).

### 2.7.1.2 Toxicocinética (ADME)

Los datos *in vitro* indican que las Ens son absorbidas y rápidamente metabolizadas a metabolitos no caracterizados (Meca et al., 2011) (Prosperini et al., 2013). Los estudios *in vivo* sugieren que la EN-B se elimina rápidamente de la sangre por excreción hepatobiliar (Rodríguez-Carrasco et al., 2016). Los metabolitos de EN-B se han encontrado tanto en hígado como en colon, lo que potencialmente contribuye a su distribución y producción de efectos tóxicos (Rodríguez-Carrasco et al., 2016) (Maranghi et al., 2018). Además, se han identificado algunos metabolitos de fase I de EN-B en hígado y colon lo que sugiere la posible contribución del metabolismo hepático e intestinal en el metabolismo de 1er paso de la EN-B (Rodríguez-Carrasco et al., 2016).

La información con respecto a la absorción de NIV es limitada, pero es rápida y parece que se distribuye y elimina sin acumulación (Poapolathep et al., 2003) (EFSA, 2013, 2017). Los conjugados de NIV pueden romperse en el tracto gastrointestinal liberando NIV (EFSA, 2014c).

En muchas ocasiones, los productos de biotransformación de las micotoxinas pueden contribuir a la toxicidad global (EFSA, 2017).

### 2.7.1.3 Mecanismo de acción

Las Ens tienen un amplio rango de actividades biológicas: son ionóforos (Meca et al., 2011), inhibidores de enzimas (Ivanova et al., 2011), y oxidantes (Prosperini et al., 2013). Son citotóxicas e inducen apoptosis, aparentemente en relación con sus propiedades ionofóricas (Meca et al., 2011) (EFSA, 2014b) (Fraeyman et al., 2017).

El NIV induce apoptosis *in vitro* en células del sistema inmune: linfocitos, células dendríticas y macrófagos (EFSA, 2013). En estudios *in vivo* el NIV tiene como diana al sistema inmune incrementando la apoptosis de los linfocitos en el timo, las placas de Peyer o el bazo (Sugita-Konishiet al., 2008). El NIV induce tanto inmunotoxicidad como hematotoxicidad. También se ha observado toxicidad reproductiva y del desarrollo, pero no se considera probable que sea un efecto crítico del NIV (EFSA, 2013).

### 2.7.1.4 Genotoxicidad y carcinogenicidad

La EN-B mostró un efecto genotóxico en médula ósea y células hepáticas tras administración oral aguda en ratones macho. No se observó daño en el ADN, mutaciones génicas o daño cromosómico tras exposición repetida (Maranghi et al., 2018). No se han identificado estudios de carcinogenicidad de Ens ni informes sobre toxicosis humanas por Ens (EFSA, 2014b).

El NIV no es probable que sea genotóxico (Le Hégarat et al., 2014), y su carcinogenicidad es desconocida en base a los estudios disponibles (EFSA, 2013). La IARC lo incluye en el grupo 3, no clasificable por su carcinogenicidad en humanos.

### 2.7.1.5 Niveles guía en salud

La EFSA concluyó que no había datos suficientes para establecer una ingesta diaria tolerable (TDI) o bien una ingesta de referencia aguda para la suma de Ens (EFSA, 2014b). Para el NIV, sin embargo, estableció una TDI de 1,2 µg/kg p.c. (EFSA, 2017).

## 2.7.2 Evaluación de la exposición

### 2.7.2.1 Métodos analíticos de detección

La cuantificación de las Ens se realiza por LC-MS(/MS) a menudo con un enfoque multi analito; UH-PLC combinada con MS o por métodos inmunohistoquímicos (Rodríguez-Carrasco et al., 2016). Sin embargo, ninguno ha sido validado inter-laboratorio y no hay materiales de referencia o estándares analíticos comercialmente disponibles (EFSA, 2014b).

Para el NIV hay métodos analíticos (principalmente LC-MS(/MS)) disponibles, pero su alta polaridad afecta a las tasas de recuperación. Así, la detección es más difícil en comparación con otros tricotecenos, lo que explica por qué otros metabolitos de fase II del NIV no hayan sido identificados aún. Los kits de ELISA son capaces de detectar NIV de forma selectiva y se han desarrollado inmunoensayos de resonancia de plasmón superficial, pero aún están en fase de investigación y no son adecuados para su aplicación rutinaria. Sin embargo, ninguno de los métodos cromatográficos o inmunológicos han sido validados en estudios interlaboratorio (EFSA, 2013) y no hay disponibles comercialmente estándares y materiales de referencia de formas modificadas de NIV (EFSA, 2017).

### 2.7.2.2 Presencia en alimentos

El Panel CONTAM de EFSA (2014b) informó de las siguientes concentraciones medias máximas para Ens en granos sin procesar: cebada (703 µg/kg), centeno (650 µg/kg), y trigo (446 µg/kg), con un límite de cuantificación (LOQ) de 0,3-10,8 µg/kg. El grano y los productos basados en grano son los que más contribuyen a la exposición, especialmente pan y bollería (EFSA, 2014b).

El NIV está presente junto con menores cantidades de otros tricotecenos en granos, principalmente en avena, maíz, cebada y trigo (Juan et al., 2016) (Rodríguez-Carrasco et al., 2016). Los granos y los alimentos basados en granos son los que contribuyen en mayor proporción a la exposición de NIV. En particular pan, bollería, productos a base de grano molido, pasta, productos de panadería fina y cereales para el desayuno (EFSA, 2013).

Tanto las Ens como el NIV, al igual que la mayoría de las micotoxinas y sus formas modificadas, se concentran en las capas externas de los granos. La limpieza, la clasificación y el fresado los redistribuyen provocando una concentración en el salvado y la fibra, con una reducción de las fracciones utilizadas para el consumo humano. Por lo tanto, los productos enriquecidos con salvado y fibra son más propensos a la contaminación (EFSA, 2014a). Son estables durante el procesamiento para su comercialización, incluidos los procedimientos de secado y ensilado (EFSA, 2013) (Rodríguez-Carrasco et al., 2016).

### 2.7.2.3 Exposición dietética

La preocupación por la salud debido a la exposición dietética a las Ens se centra en los niños pequeños (1-3 años) y los niños, ya que varios informes los señalaron como los grupos de edad con mayor riesgo. El valor medio más alto de exposición dietética crónica a Ens en niños pequeños fue de 0,42-1,82 µg/kg p.c./día, con un percentil 95 de 0,91-3,28 µg/kg p.c./día (EFSA, 2014b).

Para el NIV la exposición crónica más alta se ha estimado para niños pequeños (1-3 años), oscilando entre 4,3-202 ng/kg p.c./día para consumidores moderados y 12-484 ng/kg p.c./día para grandes consumidores (EFSA, 2013).

### 2.7.3 Caracterización del riesgo

El Panel CONTAM de EFSA (2014b) concluyó que la exposición aguda a Ens no es indicativa de preocupación para la salud humana. Podría haber preocupación con respecto a la exposición crónica, pero no se pueden sacar conclusiones definitivas ya que son necesarios datos de toxicidad *in vivo* relevantes que permitan realizar la evaluación del riesgo en humanos.

La exposición a NIV y sus formas modificadas no supone una preocupación ya que la exposición más alta (percentil 95) para grandes consumidores (12-484 ng/kg p.c./día), fue menos del 20 % de la IDT establecida para NIV (1,2 µg/kg p.c./día) (EFSA, 2013).

### 2.7.4 Niveles máximos legislados

Las Ens y el NIV no están incluidos en el anexo del Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios (UE, 2006), y no están reguladas bajo la Directiva 2002/32/EC sobre sustancias indeseables en la salud animal (UE, 2002).

### 2.7.5 Consideraciones futuras

Como conclusión, es probable que la evaluación de la exposición realizada hasta el momento haya sido infraestimada debido a la falta de métodos validados de *screening*, detección y cuantificación de toxinas emergentes tales como Ens, NIV, sus formas modificadas y sus mezclas. Además, hay una clara necesidad de evaluar más profundamente su potencial toxicológico. Se deberían hacer más esfuerzos en desarrollar y establecer programas de monitorización continuados. Son necesarios datos adicionales sobre la co-presencia, prevalencia y efectos combinados de las micotoxinas de *Fusarium*. Los métodos analíticos para Ens, NIV y sus formas modificadas deberían ser evaluadas en estudios de validación inter-laboratorios así como desarrollarse protocolos y materiales de referencia. Además, se precisa más investigación *in vivo* enfocada en dilucidar las vías metabólicas, la toxicocinética y la toxicidad y genotoxicidad tanto de Ens, NIV, sus derivados y metabolitos.

## 2.8 Alcaloides de la pirrolizidina

### 2.8.1 Identificación y caracterización del peligro

Los alcaloides de la pirrolizidina (AP) son un amplio grupo de metabolitos secundarios altamente tóxicos para humanos y animales (OMS, 2016) (EFSA, 2017). Los AP son producidos por más de 6 000 especies de plantas de las familias *Boraginaceae* (todos los géneros), *Compositae (Asteraceae)* y *Leguminosae (Fabaceae)* (género *Crotalaria*) (OMS, 2016).

#### 2.8.1.1 Estructura química

Los AP son compuestos heterocíclicos la mayoría de ellos derivados de cuatro bases de necina (platinecina, retotecina, heliotridina o otonecina) (EFSA, 2007) (Codex, 2018). La mayoría de los AP naturales son necinas esterificadas o alcaloides N-óxidos (a excepción de los alcaloides tipo otonecina), mientras que los AP no esterificados se dan con menor frecuencia en plantas (Codex,

2018). Sin embargo, nuevos AP continúan siendo identificados tanto en especies de plantas nuevas como en otras ya estudiadas (OMS, 2016).

Los AP hepatotóxicos tienen una base de necina insaturada, mientras que en los no hepatotóxicos esta base de necina está saturada. Los primeros tienen una mayor toxicidad porque pueden sufrir una activación metabólica y formar pirroles reactivos que pueden reaccionar con las proteínas y formar aductos de ADN (EFSA, 2011).

### 2.8.1.2 Toxicocinética

Los AP 1,2 insaturados son absorbidos rápidamente y distribuidos en el cuerpo. Los AP-N-óxidos son reducidos a sus bases libres en el tracto digestivo (Hessel et al., 2014) (OMS, 2016). Tras la ingestión, los AP sufren metabolismo hepático. Los AP 1,2 insaturados son metabolizados en el hígado por tres vías: (1) rotura de los enlaces éster; (2) N-oxigenación de la necina base en los AP con retronecina y heliotridina, dando lugar a N-óxidos que son más rápidamente excretados en la orina; y (3) oxidación a través del citocromo P450 (CYP450) que forma 6,7-dihidro-7-hidroxi-1-hidroximetil-5 [[H]]-ésteres de pirrolizidina (DHP) reactivos. Los ésteres DHP sufren una conjugación con glutatión y otras sustancias nucleofílicas *in vivo* y son hidrolizadas a dioles DHP. Los ésteres reactivos forman por alquilación aductos DHP con grupos nucleofílicos en muchos tejidos (OMS, 2016) (Yang et al., 2017) (Zhu et al., 2017).

### 2.8.1.3 Mecanismo de acción

Los AP no son sustancias químicamente reactivas por lo que su toxicidad es debida a su activación metabólica. El paso crucial es la formación de derivados pirrólicos (DHP) reactivos, mientras que la biotransformación a N-óxidos representa la vía más común de detoxificación (EFSA, 2007). Los metabolitos pirrólicos se unen a grupos nucleofílicos de las proteínas y ADN celulares dando lugar a aductos y enlaces cruzados (Dusemund et al., 2018). El grado de bioactivación de los pirroles tóxicos depende del grado de esterificación y de la naturaleza de los grupos éster. Por otro lado, la sensibilidad individual a los AP viene dada por el grado de expresión de las enzimas implicadas en su biotransformación (EFSA, 2007).

### 2.8.1.4 Toxicidad organoespecífica

Los AP tienen un perfil tóxico común, siendo el hígado el principal órgano diana (OMS, 2016) (EFSA, 2017) (Codex, 2018). Los principales signos de toxicidad en todas las especies animales incluyen varios grados de daño hepático progresivo (necrosis hepatocelular centrolobulillar) (Edgar et al., 2014), y enfermedad veno-oclusiva hepática (Kakar et al., 2010). Otros efectos observados incluyen proliferación de conductos biliares, megalocitosis hepática y fibrosis (NTP, 2003) (Merz y Schrenk, 2016) (Codex, 2018). No obstante, también se han indicado efectos en otros órganos: pulmones (hipertensión pulmonar), sistema cardiovascular (hipertrofia ventricular derecha) y daño degenerativo en los riñones (Codex, 2018). El efecto más importante en el hombre es la enfermedad veno-oclusiva hepática (Copples et al., 2003).

### 2.8.1.5 Genotoxicidad y carcinogenicidad

La genotoxicidad de los APs y de preparaciones que los contienen ha sido extensivamente estudiada tanto *in vitro* como *in vivo* (Merz y Schrenk, 2016) (OMS, 2016) (EFSA, 2017). Los AP 1,2-insaturados que han sido ensayados forman aductos con el ADN y son mutagénicos. La carcinogenicidad es el marcador más crítico tras la exposición prolongada a ciertos AP (OMS, 2016). La riddellina produce hemangiosarcomas en hígado de ratas y ratones y neoplasias alveolares y bronquiolares en ratones hembra (NTP, 2003). La lasiocarpina produce tumores hepatocelulares y angiosarcomas en el hígado de ratas tanto machos como hembras y tumores hematopoyéticos en hembras. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado tres AP, lasiocarpina, monocrotalina y riddellina en el grupo 2B "posible carcinógeno humano, mientras que otros AP evaluados no pudieron ser clasificados (Grupo 3) debido a la limitada información (Codex, 2018) (EFSA, 2017).

### 2.8.1.6 Valores de referencia toxicológicos y valores guía en salud

La OMS (2016) concluyó que el mecanismo de acción genotóxico de los AP no permitía establecer valores guía en salud. El Panel CONTAM de EFSA (2011) no pudo establecer una dosis de referencia aguda, pero identificó que un nivel de 2 mg/kg p.c./día estaría asociado a efectos agudos, a partir de la limitada información obtenida de intoxicaciones en humanos. El Panel CONTAM de EFSA (2017) seleccionó el límite inferior del intervalo de confianza de la dosis de referencia que produce un incremento del 10 % extra de incidencia de hemangiosarcoma hepático en ratas hembra expuestas a riddellina (BMDL<sub>10</sub> = 237 µg/kg p.c./día) como punto de referencia para la evaluación del riesgo crónico.

## 2.8.2 Evaluación de la exposición

### 2.8.2.1 Métodos analíticos de detección

Existen diversos métodos de *screening* para AP: cromatografía en capa fina, electroforesis, resonancia magnética nuclear y métodos inmunológicos. El análisis cuantitativo de los AP se realiza por LC-MS/MS o GC-MS (EFSA, 2011, 2017) (Crews, 2013) (OMS, 2016). Sin embargo, cuando se emplea HPLC-MS/MS no siempre se consigue una separación cromatográfica adecuada y los AP no se pueden distinguir por MS debido a su similar peso molecular (Crews, 2013) (Mulder et al., 2015). Por tanto, una cuantificación exacta de los AP individuales no siempre es posible.

Las principales cuestiones con respecto al análisis de AP incluyen: grandes variaciones en la concentración de AP en las muestras de alimentos; variación natural de los perfiles de AP en plantas; la estabilidad de los AP durante el almacenamiento y la cuantificación de AP individuales o de necinas totales. No se dispone de estándares de alta calidad, estándares internos ni materiales de referencia certificados, y, además, tampoco se cuenta actualmente con métodos armonizados o criterios de actuación específicos para AP (OMS, 2016).

### 2.8.2.2 Presencia en alimentos

El té y las infusiones de hierbas son los principales alimentos que contribuyen a la exposición total a AP, sin embargo, la miel también lo hace de forma significativa (Kempf et al., 2011) (EFSA, 2017)

(Dusemund et al., 2018). Según el Panel CONTAM de EFSA (2017) los principales AP presentes en té e infusiones de hierbas son: licopsamina, intermedina, intermedina-N-óxido, senecionina, senecionina-N-óxido, senecifilina, senecifilina-N-óxido y retrorsina-N-óxido. Las concentraciones medias más altas de AP fueron encontradas en rooibos (4,1 µg/l) y menta (3,5 µg/l). Y en té negro (1,6 µg/l) fueron el doble de altas con respecto al té verde (0,8 µg /l) (EFSA, 2016).

Su presencia también ha sido identificada en polen fresco de plantas productoras de AP, lo que explica su contenido en la miel y en productos a base de polen (Edgar et al., 2002) (Boppré et al., 2008) (Kempf et al., 2011). A este respecto, el Panel CONTAM determinó equimidina (44 %) y licopsamina (37 %) en mieles comerciales (EFSA, 2017).

Altos niveles de AP también se han encontrado en suplementos alimentarios obtenidos a partir de plantas productoras (Mulder et al., 2015) (EFSA, 2016). En extractos de plantas y suplementos basados en polen los principales AP fueron licopsamina, intermedina y sus N-óxidos. La senkirkina fue, sin embargo, el principal AP en el tussilago, pie de caballo o uña de caballo (*Tussilago*) (EFSA, 2017). Concentraciones medias de AP de 235-253 µg/kg se han encontrado en algunos extractos de plantas consumidos como infusiones tales como borraja (*Borago officinalis*) y consuelda (*Symphytum officinale*) (hasta 29 694 µg/kg producto seco). El eupatorio o canabina (*Eupatorium cannabinum*) vendido como cápsulas/comprimidos para su ingesta directa ha contenido 2 410 275 µg/kg, los niveles más altos de AP (EFSA, 2016).

En niños los alimentos que más contribuyen a la exposición a AP son los tés e infusiones de hierbas (EFSA, 2017).

### 2.8.3 Caracterización del riesgo

El Panel CONTAM estimó la exposición dietética aguda y crónica a AP en la población europea (EFSA, 2017). Los alimentos que más contribuyen son el té y las infusiones de hierbas. Concluyó que la exposición aguda a AP mediante el consumo de tés, infusiones de hierbas y miel es de bajo riesgo. Sin embargo, las estimaciones más altas de la exposición crónica a AP procedentes de tés e infusiones de hierbas (154-214 ng/kg p.c./día en niños) y de la miel (0,7-31 ng/kg p.c./día para jóvenes grandes consumidores) mostró una posible preocupación para la salud para consumidores frecuentes y elevados, especialmente en niños pequeños (1-3 años) y niños.

El consumo de complementos alimentarios de plantas productoras de AP puede resultar también en niveles de exposición que causan toxicidad aguda. La exposición crónica a AP vía complementos basados en polen (0,7-12 ng/kg p.c./día) también se consideró que puede dar lugar a riesgos. Sin embargo, la exposición aguda (2,8-44 ng/kg p.c./día) no (EFSA, 2017).

Así, el Panel CONTAM (EFSA, 2017) estableció un conjunto de 17 AP que debían ser monitorizados en alimentos: intermedina/licopsamina, intermedina-N-óxido/licopsamina-N-óxido, senecionina/senecivernina, senecionina-N-óxido/senecivernina-N-óxido, senecifilina, senecifilina-N-óxido, retrorsina, retrorsina-N-óxido, equimidina, equimidina-N-óxido, lasiocarpina, lasiocarpina-N-óxido y senkirkina.

### 2.8.4 Gestión del riesgo

Las regulaciones alemanas restringen el contenido de AP en productos herbáceos con probados beneficios para la salud a 1 µg/día en administración oral, y su uso es limitado a 6 semanas/año (Edgar et al., 2002). Este nivel se reduce a 0,1 µg/día de dosis oral cuando el producto se usa durante un tiempo más prolongado. Su uso en mujeres embarazadas y lactantes está específicamente prohibido, así como en aquellos productos que no hayan demostrado efectos beneficiosos para la salud. Restricciones similares en cuanto a exposición a AP en productos herbáceos se han impuesto en Holanda, Austria y Suiza (Edgar et al., 2002). No obstante, a nivel europeo no se han establecido aún concentraciones máximas permisibles de AP en ningún alimento.

### 2.8.5 Consideraciones futuras

Es necesario disponer de datos toxicológicos adicionales en relación a los AP más comúnmente encontrados en los alimentos: toxicocinética, activación metabólica y potencia carcinogénica de los AP individuales (EFSA, 2016, 2017) (Codex, 2018). También se requiere información adicional de la presencia y niveles de AP en cereales, alimentos infantiles, complementos alimentarios a base de hierbas (distintos a extractos de plantas) y polen. Pero para ello, deben desarrollarse métodos analíticos más sensibles y desarrollar protocolos especializados para el análisis de los AP más relevantes en alimentos. Además, se requiere investigación adicional sobre las plantas responsables de la presencia de AP en té, infusiones de hierbas, polen o miel y desarrollar medidas adecuadas para controlar la infestación por éstas. También se deberían tener en cuenta otros AP no incluidos entre los 17 que requieren monitorización según EFSA. Finalmente, y debido al posible riesgo detectado en ciertos grupos de población por consumo de AP presentes en determinados alimentos, se debería considerar establecer medidas de gestión del riesgo tales como fijar concentraciones máximas permisibles.

## Conclusiones del Comité Científico

Se ha llevado a cabo una revisión de algunos peligros químicos para los que no existe una regulación específica y que pueden suponer un riesgo emergente para la salud. La relación de peligros que se abordan en este informe no pretende ser exhaustiva, ya que no contempla todos los posibles peligros químicos novedosos y su enfoque es el de servir de punto de partida para la posible realización de estudios prospectivos, razón por la cual se presta especial atención a señalar los alimentos que pueden ser de especial importancia en relación a los peligros contemplados.

Al mismo tiempo se han identificado lagunas en el estudio de dichos peligros, lo cual puede servir para promover actividades de investigación encaminadas a obtener nuevos datos relevantes para su correcta evaluación.

Se ha incluido información específica sobre la descripción de la identificación y caracterización de cada uno de los peligros revisados, la evaluación de la exposición, así como una serie de recomendaciones para la gestión del riesgo y consideraciones futuras sobre las posibilidades de control en la cadena alimentaria, que puede servir para mejorar el conocimiento de los mismos entre los consumidores y otros sectores involucrados.

## Referencias

### Cilindrospermopsina

- Banker, R., Carmeli, S., Teltsch, B. y Sukenik, A. (2000). 7-epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret. *Journal of Natural Products*, 63, pp: 387-389.
- BOE (2003). Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE N° 45 de 21 de febrero de 2003, pp: 7228-7245.
- Buratti, F., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E. y Funari, E. (2017). Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of Toxicology*, 91, pp: 1049-1130.
- Byth, S. (1980). Palm Island mystery disease. *Medical Journal*, 2, pp: 40-42.
- De Almeida, C., de Arruda, A., de Queiroz, E., Costa, H., Barbosa, P.F., Lemos, T., Oliveira, C., Schwarz, A. y Kujbida, P. (2013). Oral exposure to cylindrospermopsin in pregnant rats: Reproduction and foetal toxicity studies. *Toxicol*, 74, pp: 127-129.
- Cirés, S. y Ballot, A. (2016). A review of the phylogeny, ecology and toxin production of bloom-forming *Planktothrix* spp. and related species within the Nostocales (cyanobacteria). *Harmful Algae*, 54, pp: 21-43.
- Falconer, I., Hardy, S., Humpage, A., Frosco, S., Tozer, G.J. y Hawkins, P.R. (1999). Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (1), pp: 143-150.
- Frosco, S., Humpage, A.R., Burcham, P.C. y Falconer, I.R. (2003). Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, pp: 243-251.
- Gutiérrez-Praena, D., Jos, A., Pichardo, S., Moyano, R., Blanco, A., Monterde, J.G. y Cameán, A.M. (2012). Time-dependent histopathological changes induced in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after acute exposure to pure cylindrospermopsin by oral and intraperitoneal route. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76, pp: 102-113.
- Guzmán-Guillén, R., Prieto, A.I., González, A.G., Soria-Díaz, M.E. y Cameán, A.M. (2012). Cylindrospermopsin determination in water by LC-MS/MS: Optimization and validation of the method and application to real samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (10), pp: 2233-2238.
- Guzmán-Guillén, R., Prieto, A.I., Martín-Cameán, A. y Cameán, A.M. (2015). Beneficial effects of vitamin E supplementation against the oxidative stress on Cylindrospermopsin-exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Toxicol*, 104, pp: 34-42.
- Humpage, A.R. y Falconer, I.R. (2003). Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss Albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, pp: 94-103.
- Kokocinski, M., Cameán, A.M., Carmeli, S., Guzmán-Guillén, R., Jos, A., Mankiewicz-Boczek, J., Metcalf, J.S., Moreno, I., Prieto, A.I. y Sukenik, A. (2017). Chapter 12 cylindrospermopsin and congeners. En libro: *Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, 1ª Edición. Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A., Eds.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, pp: 127-137.
- Mohamed, Z.A. y Al-Shehri, A.M. (2013). Assessment of cylindrospermopsin toxin in an arid Saudi lake containing dense cyanobacterial bloom. *Environmental Monitoring Assessment* 185 (3), pp: 2157-2166.
- Norris, R., Eaglesham, G.K., Pierens, G., Shaw, G.R., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Seawright, A.A. y Moore, M.R. (1999). Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, pp: 163-165.
- Norris, R.L., Seawright, A.A., Shaw, G.R., Senogles, P., Eaglesham, G.K., Smith, M.J., Chiswell, R.K. y Moore, M.R. (2002). Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin in vivo in the mouse. *Toxicol*, 40 (4), pp: 471-476.

- Ohtani, I., Moore, R.E. y Runnegar, M.T.C. (1992). Cylindrospermopsin-A potent hepatotoxin from the bluegreen alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*, 114, pp: 7941-7942.
- Pichardo, S., Cameán, A.M. y Jos, A. (2017). *In Vitro* Toxicological Assessment of Cylindrospermopsin: A Review. *Toxins* 9, 402; doi: 10.3390/toxins9120402.
- Quesada, A., Moreno, E., Carrasco, D., Paniagua, T., Wormer, L., De Hoyos, C. y Sukenik, A. (2006). Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. *European Journal of Phycology*, 41, pp: 39-45.
- Runnegar, M.T., Kong, S.M., Zhong, Y.Z. y Lu, S.C. (1995). Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 49, pp: 219-225.
- Rzymiski, P. y Poniedziałek, B. (2014). In search of environmental role of cylindrospermopsin: A review on global distribution and ecology of its producers. *Water Research*, 66, pp: 320-337.
- Seawright, A.A., Nolan, C.C., Shaw, G.R., Chiswell, R.K., Norris, R.L., Moore, M.R. y Smith, M.J. (1999). The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (1), pp: 135-142.
- Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Ito, E. y Watanabe, M. (1994). Electron-microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green-alga *Umezakia natans*. *Toxicon*, 32 (7), pp: 833-843.
- Testai, E., Buratti, F.M., Funari, E., Manganelli, M., Vichi, S., Arnich, N., Biré, R., Fessard, V. y Sialehaamo, A. (2016). Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. *EFSA supporting publication*: EN-998, pp: 1-309.
- Triantis, T.M., Kaloudis, T. y Hiskia, A. (2017). SOP 16. Determination of cylindrospermopsin in filtered and drinking water by LC-MS/MS. En libro: *Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, 1ª Edición. Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A., Eds.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, pp: 399-404.
- Zegura, B., Straser, A. y Filipic, M. (2011). Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins-a review. *Mutation Research*, 727, pp: 16-41.

### **Cloropropanoles y Glicidol**

- AOCS (2013a). American Oil Chemists' Society. Joint AOCS/JOCS Official Method Cd 29a-13: 2- and 3-MCPD fatty acid esters and glycidol fatty acid esters in edible oils and fats by acid transesterification. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 3ª Impresión, 2013-2014. Additions and Revisions. 6ª Edición. Urbana.
- AOCS (2013b). American Oil Chemists' Society. Joint AOCS/JOCS Official Method Cd 29b-13: Determination of Bound Monochloropropanediol-(MCPD-) and Bound 2,3-Epoxy-1-propanol (glycidol-) by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 3ª Impresión, 2013-2014. Additions and Revisions. 6ª Edición. Urbana.
- AOCS (2013c). American Oil Chemists' Society. Joint AOCS/JOCS Official Method Cd 29c-13: Fattyacid-bound 3-Chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 2,3-Epoxy-propane-1-ol (glycidol), Determination in Oils and Fats by GC/MS (Differential Measurement). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 6ª Edición, 2013-2014. Additions and Revisions. 6ª Edición. Urbana.
- Becalski, A., Feng, S., Lau, B.P.Y. y Zhao, T.X.M. (2015). A pilot survey of 2- and 3-monochloropropanediol and glycidol fatty acid esters in foods on the Canadian market 2011-2013. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, pp: 58-66.
- BfR (2007). Bundesinstitut für Risikobewertung. Infant formula and follow-up formula may contain harmful 3-MCPD fatty acid esters. *BfR Opinion* No. 047/2007.
- BLL (2016). Federación alemana de derecho alimentario y ciencia de los alimentos. Toolbox for the Mitigation of 3-MCPD Esters and Glycidyl Esters in Food. Disponible en: [https://www.ovid-verband.de/fileadmin/user\\_](https://www.ovid-verband.de/fileadmin/user_)

- upload/Hintergrundpapiere/2016-02\_BLL\_Toolbox\_3-MCPD\_Glycidyl-Fettsaeureester\_Englisch.pdf [acceso: 12-11-18].
- CCCF (2018). Comité del *Codex* sobre contaminantes de los alimentos. Anteproyecto de código de prácticas para reducir los ésteres de 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPDE) y los ésteres glicídilicos (GE) en los aceites refinados y los productos de aceites refinados, especialmente en los preparados para lactantes. CX/CF 18/12/9.
- Crews, C., Hough, P., Brereton, P., Harvey, D., MacArthur, R y Matthews, W. (2002). Survey of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in selected food groups, 1999-2000. *Food Additives and Contaminants*, 19, pp: 22-27.
- EFSA (2013). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Analysis of occurrence of 3- monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009-2011 and preliminary exposure assessment. *EFSA Journal*, 11 (9): 3381, pp: 1-45.
- EFSA (2016). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. *EFSA Journal*, 14 (5): 4426, pp: 1-159.
- EFSA (2018). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Update of the risk assessment on 3-monochloropropane diol and its fatty acid esters. *EFSA Journal*, 16 (1), pp: 5083.
- FAO (2007). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Comité del Codex sobre Contaminantes de los Alimentos, 1ª Reunión. Documento de debate sobre cloropropanoles obtenidas por fabricación de proteínas vegetales hidrolizadas mediante ácido y procesado térmico de los alimentos, Beijing (China). Disponible en <http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCCF/cccf1/cf0113as.pdf> [acceso: 12-11-18].
- FEDIOL (2015). Federación Europea de la Industria Aceitera. MCPD Esters and Glycidyl Esters. Review of Mitigation Measures. Ref. 15SAF108. Disponible en: <http://www.fediol.be/data/FEDIOL%20Review%20of%20Mitigation%20Measures%20MCPD%20Esters%20and%20Glycidyl%20Esters%20-%202024%20June%202015.pdf> [acceso: 12-11-18].
- FSA (2009). Agencia Británica de Seguridad Alimentaria. Survey of process contaminants in retail foods 2008. Food Survey information sheet.
- Haines, T.D., Adlaf, K.J., Pierceall, R.M., Lee, I., Venkitasubramanian, P. y Collison, M.W. (2011). Direct Determination of MCPD Fatty Acid Esters and Glycidyl Fatty Acid Esters in Vegetable Oils by LC–TOFMS. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, pp: 1-14.
- Hamlet, C.G., Sadd, P.A. y Gray, D.A. (2004a). Generation of monochloropropanediols (MCPDs) in model dough systems. 1 Leavened doughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp: 2059-2066.
- Hamlet, C.G., Sadd, P.A. y Gray, D.A. (2004b). Chloropropanols and their esters in cereal products. *Czech Journal of Food Sciences*, 22, pp: 259-262.
- IARC (2000). Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Glycidol. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 77, pp: 469-486.
- IARC (2012). Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. 3- Monochloro-1,2-propanediol. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 101, pp: 349-374.
- ILSI (2011). Instituto Internacional de Ciencias de la Salud. MCPD and glycidyl esters in food products. *ILSI Europe Report Series* 2011, pp: 1-24. Disponible en: <http://ilsa.org/publication/mcpd-and-glycidyl-esters-in-food-products/> [acceso: 12-11-18].
- IFST (2011). Institute of Food Science & Technology. 3-MCPD in Foods. Information Statement. Disponible en: <http://www.ifst.org/> [acceso: 12-11-18].
- JECFA (2001). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Evaluation of certain food additives and contaminants: fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, 5-14 June 2001. WHO technical report series 909, pp: 171. Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42578> [acceso: 12-11-18].

- JECFA (2006). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, 20-29 June 2006. WHO technical report series 940, pp: 49-56. Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_940\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_940_eng.pdf) [acceso: 12-11-18].
- JECFA (2016). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Evaluation of certain contaminants in food: eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, 8-17 November 2016. WHO Technical Report Serie 1002. Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/254893> [acceso: 12-11-18].
- Jędrkiewicz, R., Głowacz-Różyńska, A., Gromadzka, J., Kloskowski, A. y Namieśnik, J. (2016). Indirect Determination of MCPD Fatty Acid Esters in Lipid Fractions of Commercially Available Infant Formulas for the Assessment of Infants' Health Risk. *Food Analytical Methods*, 9, pp: 3460-3469.
- JRC (2017) Joint Research Center. Development and validation of analytical methods for the analysis of 3-MCPD (both in free and ester form) and glycidyl esters in various food matrices and performance of an ad-hoc survey on specific food groups in support to a scientific opinion on comprehensive risk assessment on the presence of 3-MCPD and glycidyl esters in food. JRC (IRMM) 2015. Disponible en: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-researchreports/development-and-validation-analytical-methods-analysis-3-mcpd-both-free-and-ester-form-and> [acceso: 12-11-18].
- Leigh, J.K. y MacMahon, S. (2016). Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Detection of 3-Monochloropropanediol Esters and Glycidyl Esters in Infant Formula. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (49), pp: 9442-9451.
- Leigh, J. y MacMahon, S. (2017). Occurrence of 3-monochloropropanediol esters and glycidyl esters in commercial infant formulas in the United States. *Food Additives & Contaminants*, Part A, 34: 3, pp: 356-370.
- Lu, J., Huang, G., Zhang, S., Song, B., Wang, Z., Xu, L., Zhang, S. y Guan, S. (2013). The inhibition of 2,3-dichloro-1-propanol on T cell in vitro and in vivo. *International Immunopharmacology*, 17 (2), pp: 321-328.
- Lu, J., Huang, G., Hu, S., Wang, Z. y Guan, S. (2014). 1,3-Dichloro-2-propanol induced hyperlipidemia in C57BL/6J mice via AMPK signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 64, pp: 403-409.
- Pace, G.V. y Hartman, T.G. (2010). Migration studies of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in polyethylene extrusion-coated paperboard food packaging. *Food Additives & Contaminants*, Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 27, pp: 884-891.
- Pavesi Ariseto, A., Cruzeiro Silva, W., Scaranelo, G. y Vicente, E. (2017). 3-MCPD and glycidyl esters in infant formulas from the Brazilian market: Occurrence and risk assessment. *Food Control*, 77, pp: 76-81.
- Rahn, A. y Yaylayan, V.A. (2010). Thermal degradation of sucralose and its potential in generating chloropropanols in the presence of glycerol. *Food Chemistry*, 118, pp: 56-61.
- SCF (2001). Comité Científico de la Alimentación Humana. Opinion of the Scientific Committee on Food on 3-monochloro-propane-1,2-diol (3-MCPD) updating the SCF opinion of 1994. Adopted on 30 May 2001. Disponible en: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs\\_contaminants\\_catalogue\\_mcpd\\_out91\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_mcpd_out91_en.pdf) [acceso: 12-11-18].
- UE (2006). Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DO L 364, 20 de diciembre de 2006, pp: 5-24.
- UE (2007). Reglamento (CE) N° 333/2007 de la Comisión de 28 de marzo de 2007 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPD y benzo(a)pireno en los productos alimenticios. DO L 88, 29 de marzo de 2007, pp: 29-38.
- UE (2011). Reglamento (UE) N° 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. DO L 12, 15 de enero de 2011, pp: 1-89.

- UE (2014). Recomendación de la Comisión de 10 de septiembre de 2014 sobre el control de la presencia de 2- y 3-monocloropropano-1,2-diol (2- y 3-MCPD), de ésteres de ácidos grasos de 2- y 3-MCPD y de ésteres glicídicos de ácidos grasos en los alimentos. DO L 271, 12 de septiembre de 2014, pp: 93-95.
- UE (2018). Reglamento (UE) 2018/290 de la Comisión, de 26 de febrero de 2018, por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por lo que respecta a los contenidos máximos de ésteres glicídicos de ácidos grasos en los aceites y grasas vegetales, los preparados para lactantes, los preparados de continuación y los alimentos para usos médicos especiales destinados a los lactantes y niños de corta edad. DO L 55, 27 de febrero de 2018, pp: 27-29.
- Velišek, J., Davidek, J., Hajslova, J., Kubelka, V.J., Janíček, G. y Mankova, B. (1978). Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 167, pp: 241-244.
- Weißhaar, R. y Perz, R. (2010). Fatty acid ester of glycidol in refined fats and oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, pp: 158-165.
- Wöhrlin, F., Fry, H., Lahrssen-Wiederholt, M. y Preiß-Weigert, A. (2015). Occurrence of fatty acid esters of 3-MCPD, 2-MCPD and glycidol in infant formula. *Food Additives & Contaminants*, 11, pp: 1-13.
- Zelinková, Z., Doležal, M. y Velišek, J. (2009). Occurrence of 3-chloropropane-1,2-diol fatty acid esters in infant and baby foods. *European Food Research and Technology*, 228, pp: 571-578.

### Furano y derivados

- Anese, M. y Suman, M. (2013). Review Mitigation strategies of furan and 5-hydroxymethylfurfural in food. *Food Research International*, 51, pp: 257-264.
- ANSES (2016). Agence nationale de securite sanitaire alimentation, environnement, travail. Etude de l'alimentation totale infantile, 372.
- Arisseto, A. y Toledo, M.C. (2008). Revisão: Furano: um contaminante formado durante o processamento de alimentos. *Brazilian Journal Food Technology*, 11 (1), pp: 1-11.
- Becalski, A., Halldorson, T., Hayward, S. y Roscoe, V. (2016). Furan, 2-methylfuran and 3-methylfuran in coffee on the Canadian market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47, pp: 113-119.
- Cepeda-Vázquez, M., Rega, B., Descharles, N. y Camel, V. (2018). How ingredients influence furan and aroma generation in sponge cake. *Food Chemistry*, 245, pp: 1025-1033.
- Condurso, C., Cincotta, F. y Verzera, A. (2018). Determination of furan and furan derivatives in baby food. *Food Chemistry*, 250, pp: 155-161.
- Crews, C. y Castle, L. (2007). A review of the occurrence, formation and analysis of furan in heat processed foods. A Review. *Trends in Food Science and Technology* 18, pp: 365-372.
- EFSA (2004). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Report of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on provisional findings on furan in food. *EFSA Journal*, 137, pp: 1-20.
- EFSA (2009). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Results on the monitoring of furan levels in food. A report of the Data Collection and Exposure Unit in Response to a request from the European Commission. *EFSA Journal*, 304, pp: 1-23.
- EFSA (2010). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Update of results on the monitoring of furan levels in food. *EFSA Journal*, 8 (7): 1702.
- EFSA (2011). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Update on furan levels in food from monitoring years 2004-2010 and exposure assessment. *EFSA Journal*, 9 (9): 2347.
- EFSA (2017). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Risks for public health related to the presence of furan and methylfurans in food. *EFSA Journal*, 15 (10): 5005.
- Fan, X. (2005a). Formation of furan from carbohydrates and ascorbic acid following exposure to ionizing radiation and thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp: 7826-7831.
- Fan, X. (2005b). Impact of ionizing radiation and thermal treatments on furan levels in fruit juice. *Journal of Food Science*, 71, pp: 409-414.

- Fan, X. y Sommers, C.H. (2006). Effect of gamma radiation on furan formation in ready-to-eat products and their ingredients. *Journal of Food Science*, 71, pp: C407-C412.
- Fan, X. y Geveke, D.J. (2007). Furan formation in sugar solution and apple cider upon ultraviolet treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (19), pp: 7816-7821.
- Fan, X. y Sokorai, K.J. (2008). Effect of ionizing radiation on furan formation in fresh-cut fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 73 (2), pp: C79-C83.
- Fan, X. (2015). Furan formation from fatty acids as a result of storage, gamma irradiation, UV-C and heat treatments. *Food Chemistry*, 175, pp: 439-444.
- FAO/OMS (2011). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud. Documento debate sobre el furano. Comité del Codex sobre contaminantes de los alimentos, 5º reunión, La Haya, Países Bajos, 21-25 de marzo de 2011.
- FDA (2004a). US Food and Drug Administration. Furan in food, thermal treatment, request for data and information. Disponible en: <https://www.federalregister.gov/documents/2004/05/10/04-10588/furan-in-food-thermal-treatment-request-for-data-and-information>. [acceso: 12-11-18].
- FDA (2004b). US Food and Drug Administration. Exploratory Data on Furan in Food. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/chemicalcontaminants/ucm078439.htm>. [acceso: 12-11-18].
- FDA (2004c). US Food and Drug Administration. Determination of furan in foods. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/chemicalcontaminants/ucm078400.htm> [acceso: 12-11-18].
- FDA (2006). US Food and Drug Administration. Determination of furan in foods. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/chemicalcontaminants/ucm078400.htm> [acceso: 12-11-18].
- FDA (2007). US Food and Drug Administration. An updated exposure assessment for furan from the consumption of adult and baby foods. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/chemicalcontaminants/ucm2006786.htm> [acceso: 12-11-18].
- FDA (2008). US Food and Drug Administration. Exploratory Data on Furan in Food: Individual Food Products. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/chemicalcontaminants/ucm078439.htm> [acceso: 12-11-18].
- FERA (2009). Agencia Británica de Investigación para los Alimentos y el Medio Ambiente, Consumer exposure to furan from heat-processed foods and kitchen air. Scientific/Technical Report submitted to EFSA.
- FSA (2012). Agencia Británica de Seguridad Alimentaria. A rolling programme on surveys on process contaminants in UK retail foods, Acrylamide & furan: Survey 4. Food Survey Information Sheet, Number 02/12. Disponible en: [https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/acrylamide-furan-survey\\_0.pdf](https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/acrylamide-furan-survey_0.pdf) [acceso: 12-11-18].
- FSA (2017). Agencia Británica de Seguridad Alimentaria. A rolling programme of surveys on process contaminants in UK retail foods report covering sampling of acrylamide & furan 2014-2015.
- Health Canada (2016). Update on the assessment of exposure to furan from the Canadian retail food supply, pp: 1-13.
- IARC (1995). Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Furan. IARC monographs. Volume 63, pp: 393-407.
- JECFA (2011). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Evaluation of certain contaminants in food. Seventy-second meeting report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, World Technical Report Series 959, pp: 48-55.
- Juaniz, I., Zocco, C., Mouro, V., Cid, C. y De Peña, M.P. (2016). Effect of frying process on furan content in foods and assessment of furan exposure of Spanish population. *LWT-Food Science and Technology*, 68, pp: 549-555.
- Lawely, R., Curtis, L. y Davis, J. (2012). The Food Safety Hazard Guidebook. RSC Publishing, second edition, Cambridge, Reino Unido, pp: 358-360.
- Mesías, M. y Morales, F.J. (2014). Reliable estimation of dietary exposure to furan from coffee: an automatic vending machine as a case study. *Food Research International*, 61, pp: 257-263.

- NAS (2000). Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos. Spacecraft maximum allowable concentrations for selected airborne contaminants, 4, pp: 1-386. National Academies Press, Washington, DC. Disponible en: <https://www.nap.edu/catalog/12529/spacecraft-maximum-allowable-concentrations-for-selected-airborne-contaminants-volume-5> [acceso: 12-11-18].
- Palmers, S., Grauwet, T., Celus, M., Wibowo, S., Kebede, B.T., Hendrickx, M.E. y Van Loey, A. (2015). A kinetic study of furan formation during storage of shelf-stable fruit juices. *Journal of Food Engineering*, 165, pp: 74-81.
- Pérez-Palacios, T., Petisca, C., Henriques, R. y Ferreira, I.M.P.L.V.O. (2013). Impact of cooking and handling conditions on furanic compounds in breaded fish products. *Food and Chemical Toxicology*, 55, pp: 222-228.
- Rannou, C., Laroque, D., Renault, E., Prost, C. y Sérot, T. (2016). Mitigation strategies of acrylamide, furans, heterocyclic amines and browning during the Maillard reaction in foods. *Food Research International*, 90, pp: 154-176.
- Shen, M., Zhang, F., Hong, T., Xie, J., Wang, Y., Nie, S. y Xie, M. (2017). Comparative study of the effects of antioxidants on furan formation during thermal processing in model systems. *LWT-Food Science and Technology*, 75, pp: 286-292.
- UE (2007a). Recomendación de la Comisión 2007/196/EC, de 28 de marzo de 2007, relativa al seguimiento de la presencia de furano en productos alimenticios. DO L 88 de 29 de marzo de 2007, pp: 56-57.
- UE (2007b). Reglamento (CE) Nº 333/2007 de la Comisión, de 28 de marzo de 2007, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPD y benzo(a)pireno en los productos alimenticios. DO L 88 de 29 de marzo de 2007, pp: 29-38.
- VKM (2012). Autoridad Noruega de Seguridad Alimentaria. Risk assessment of furan exposure in the Norwegian population; Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids, Materials in Contact with Food and Cosmetics and the Panel on Contaminants of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety, pp: 1-107.
- Zheng, L.W., Chung, H. y Kim, Y-S. (2015). Effects of dicarbonyl trapping agents, antioxidants and reducing agents on the formation of furan and other volatile components in canned-coffee model systems. *Food Research International*, 75, pp: 328-336.

### **Hidrocarburos de aceites minerales**

- AECOSAN (2017). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Aceites minerales. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/ampliacion/aceites\\_minerales.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/aceites_minerales.htm) [acceso: 12-11-18].
- DIN EN (2017). Foodstuffs-Vegetable oils and foodstuffs on the basis of vegetable oils- Determination of mineral oil saturated hydrocarbans (NOSH) and mineral oil aromatic hydrocarbons (NOAH) with on-line HPLC-GC-FID analysis. DIN EN 16955: 2017-08. 2017.
- EFSA (2009). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Opinión Científica sobre el uso de aceites minerales blancos de alta viscosidad como aditivo alimentario. *EFSA Journal*, 7 (11): 1387, pp: 1-39.
- EFSA (2012). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Dictamen científico sobre la presencia de hidrocarburos de aceite mineral en alimentos. *EFSA Journal*, 10 (6): 2704, pp: 1-185.
- FEICA (2017). Association of the European Adhesive and Sealant Industry. Directrices de FEICA para evaluar la conformidad del contacto alimentario de los adhesivos que contienen hidrocarburos de aceites minerales. Guía FEICA. Disponible en: [http://www.feica.eu/documents/document/20170626140840-es\\_gup-ex-g05-019\\_feica\\_guidance\\_fc\\_status\\_adhesives\\_mineral\\_oil.pdf](http://www.feica.eu/documents/document/20170626140840-es_gup-ex-g05-019_feica_guidance_fc_status_adhesives_mineral_oil.pdf) [acceso: 12-11-18].
- FAO/OMS (2002). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud. Evaluación de algunos aditivos alimentarios: Informe 59th del comité conjunto de expertos FAO/WHO en aditivos alimentarios. Serie de Informes Técnicos de OMS, 913. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44062/WHO\\_TRS\\_952\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44062/WHO_TRS_952_eng.pdf?sequence=1) [acceso: 12-11-18].

FoodDrink Europe. 2018. Toolbox for preventing the transfer of undesired mineral oil hydrocarbons into foods. Disponible en: <https://www.fooddrinkurope.eu/publication/preventing-transfer-of-undesired-mineral-oil-hydrocarbons-into-food/> [acceso: 12-11-18].

UE (2017). Recomendación 2017/84 de la Comisión, de 16 de enero de 2017, sobre vigilancia de hidrocarburos de aceites minerales en alimentos y en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos. DO L 12 de 17 de enero de 2017, pp: 95-96.

### Micotoxinas de *Claviceps*

Bauer, J.I., Gross, M., Gottschalk, C. y Usleber, E. (2016). Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. *Food Control*, 63, pp: 135-139.

Blaney, B.J., Ryley, M.J. y Boucher, B.D. (2010). Early harvest and ensilage of forage sorghum infected with ergot (*Claviceps africana*) reduces the risk of livestock poisoning, *Australian Veterinary Journal*, 88, pp: 311-312.

Codex Alimentarius (2016). Comité sobre contaminantes de los alimentos. Documento de debate sobre la elaboración de un anexo adicional sobre los alcaloides del cornezuelo para su posible inclusión en el código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas (CAC/RCP 51-2003).

De Ruyc, K., De Boevre, M., Huybrechts, I. y De Saeger, S. (2015). Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research*, 766, pp: 32-41.

EFSA (2005). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Panel on Contaminants in the Food Chain. Scientific Opinion related to ergot as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal*, 3 (5): 225.

EFSA (2012). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*, 10 (7): 2798.

EFSA (2017). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Arcella D, Gómez-Ruiz JA, Innocenti ML and Roldán R. Scientific report on Human and animal dietary exposure to ergot alkaloids. *EFSA Journal*, 15 (7): 4902.

Fajardo, J.E., Dexter, J.E., Roscoe, M.M. y Nowicki, T.W. (2012). Retention of Ergot Alkaloids in Wheat during Processing. *Cereal Chemistry*, 72 (3), pp: 291-298.

Mariné, A. (2012). Las micotoxinas del cornezuelo del centeno: ¿un viejo problema que vuelve? ACSA brief. *Riesgos emergentes*. Septiembre-octubre, pp: 1-4.

UE (2015). Reglamento (UE) N° 2015/1940 de la Comisión, de 28 de octubre de 2015, por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 en relación con el contenido máximo de esclerocios de cornezuelo de centeno en determinados cereales no elaborados y con las disposiciones sobre seguimiento y presentación de informes. DO L 283 de 29 de octubre de 2015, pp: 3-6.

### Toxinas de *Alternaria*

Azaiez, I., Meca, G., Manyes, L., Luciano, F.B. y Fernandez-Franz on, M. (2013). Study of the chemical reduction of the fumonisins toxicity using allyl, benzyl and phenyl isothiocyanate in model solution and in food products. *Toxicon*, 63, pp: 137-146.

Barkai-Golan, R. (2008). *Alternaria* mycotoxins. En libro: *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Barkai-Golan, R., Nachman, P. (Eds.). Academic Press, San Diego, CA, USA, pp: 185-203.

Barros, G.G., Oviedo, M.S., Ramirez, M.L. y Chulze, S.N. (2011). Safety aspects in soybean food and feed chains: fungal and mycotoxins contamination. En libro: *Soybean: Biochemistry, Chemistry and Physiology*. Tzi-Bun N (Ed.). InTech, Croatia, 2011, pp: 7-20.

Bobolea, I., Barranco, P., Jurado-Palomo, J., Pedrosa, M. y Quirce, S. (2009). Allergy to Dry Fermented Sausage. *Journal of Investigation on Allergology and Clinical Immunology* 19 (4), pp: 324-325.

Bretz, M., Beyer, M., Cramer, B., Knecht, A. y Humpf, H.U. (2006). Thermal degradation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, pp: 6445-6451.

- Burkhardt, B., Pfeiffer, E. y Metzler, M. (2009). Absorption and metabolism of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in Caco-2 cells in vitro. *Mycotoxin Research*, 25 (3), pp: 149-157.
- Burkhardt, B., Wittenauer, J., Pfeiffer, E., Schauer, U.M.D. y Metzler, M. (2011). Oxidative metabolism of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in precision-cut rat liver slices in vitro. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, pp: 1079-1086.
- De Vouge, M., Thaker, A., Zhang, L., Muradia, G., Rode, H. y Vijay, H. (1998). Molecular cloning of ig-E binding fragment of *Alternaria alternata* allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 116, pp: 261-268.
- EFSA (2010). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. *EFSA Journal*, 8 (3): 1557, pp: 96.
- EFSA (2011). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*, 9 (10), pp: 2407-2497.
- EFSA (2016). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Scientific report on the dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA Journal*, 14 (12), pp: 4654-4685.
- Fehr, M., Pahlke, G., Fritz, J. y Morten, O. (2009). Alternariol act a topoisomerase poison, preferentially affecting the alpha isophorm. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, pp: 441-451.
- Fernández-Cruz, M.L., Mansilla, M.L y Tadeo, J.L. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1, pp: 113-122.
- Giambrone, J.J., Davis, N.D. y Diener, U.L. (1978). Effect of tenuazonic acid on young chickens. *Poultry Science*, 57, pp: 1554-1558.
- Griffin, G.F. y Chu, F.S. (1983). Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol monomethyl ether, altenuene and tenuazonic acid in the chicken embryo assay. *Applications on Environmental Microbiology*, 46, pp: 1420-1422.
- Horiuchi, M., Tokuda, H., Ohnishi, K., Yamashita, M., Nishino, H. y Maoka, T. (2006). Porritoxins, metabolites of *Alternaria porri*, as anti-tumor-promoting active compounds. *Natural Product Research*, 20, pp: 161-166.
- Kwon, H.J., Kim, J-H., Kim, M., Lee, J-K., Hwang, W-S. y Kim, D.Y. (2003). Anti-parasitic activity of depudecin on *Neospora caninum* via the inhibition of histone deacetylase. *Veterinarian. Parasitology*, 112, pp: 269-276.
- Lehmann, L., Wagner, J. y Metzler, M. (2006). Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food Chemistry Toxicology*, 44, pp: 398-408.
- Liu, G.T., Qian, Y.Z., Zhang, P., Dong, Z.M., Shi, Z.Y., Zhen, Y.Z., Miao, J. y Xu, Y.M. (1991). Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. En libro: *Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins*. O'Neill, I.K., Chen, J. and Bartsch, H. (Eds.) IARC Scientific Publications No. 105, IARC, Lyon, France, pp: 258-262.
- Liu, G., Qian, Y., Zhang, P., Dong, W., Qi, Y. y Guo, H. (1992). Etiological role of *Alternaria alternata* in human oesophageal cancer. *China Medical Journal*, 105, pp: 394-400.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A. y Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean cops. *Europea Journal of Plant Pathology*, 109, pp: 645-667.
- Lou, J., Fu, L., Peng, Y. y Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria fungi* and their bioactives. *Molecules*, 18, pp: 5891-5935.
- Luz, C., Saladino, F., Luciano, F.B., Manes, J. y Meca, G. (2017). Occurrence, toxicity, bioaccessibility and mitigation strategies of beauvericin, a minor *Fusarium* mycotoxin. *Food Chemical Toxicology*, 107, pp: 430-439.
- Meca, G., Ritieni, A. y Manes, J. (2012a). Influence of the heat treatment on the degradation of the minor *Fusarium* mycotoxin beauvericin. *Food control*, 28, pp: 13-18.
- Meca, G., Ritieni, A. y Manes, J. (2012b). Reduction in vitro of the minor *Fusarium* mycotoxin beauvericin employing different strains of probiotic bacteria. *Food control*, 28, pp: 435-440.
- Meca, G., Zhou, T., Li, X.Z. y Manes, J. (2013a). Beauvericin degradation during bread and beer making. *Food control*, 34, pp: 1-8.

- Meca, G., Zhou, T., Li, X.Z., Ritieni, A. y Manes, J. (2013b). Ciclohexadesipeptide beauvericin degradation by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry Toxicology*, 59, pp: 334-338.
- Nazareth, T.M., Bordin, K., Manyes, L., Meca, G., Manes, J. y Luciano, F.B. (2016). Gaseous allyl isothiocyanate to inhibit the production of aflatoxins, beauvericin and enniatins by *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium poae* in wheat flour. *Food control*, 62, pp: 317-321.
- Ostry, V., Skarkova, J. y Ruprich, J. (2004). Occurrence of *Alternaria mycotoxins* and *Alternaria spp.* in lentils and human health. En libro: *Gesellschaft für Mykotoxin Forschung*. Proceedings of the 26th mycotoxin workshop, Herrsching, Germany, pp: 87.
- Ostry, V. (2008). *Alternaria mycotoxins*: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1, pp: 175-188.
- Päivi, M., Samuel, J., Server, M., Renee, J., Richard, C., Stephanie, L. y Darry, Z. (2006). Exposure to *Alternaria alternata* in US homes is associated with. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 118 (4), pp: 892-898.
- Pastor, E. y Guarro, J. (2008). *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clinical Microbiology Infections*, 14, pp: 734-746.
- Pavón, M.A., Luna, A., de la Cruz, S., González, I., Martín, R. y García, T. (2012). PCR-based assay for the detection of *Alternaria* species and correlation with HPLC determination of altenuene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products. *Food Control*, 25, pp: 45-52.
- Pero, R.W., Posner, H., Blois, M., Harvan, D. y Spalding, J.W. (1973). Toxicity of metabolites produced by the "Alternaria". *Environmental Health Perspective*, 4, pp: 87-94.
- Pfeiffer, E., Schebb, N.H., Podlech, J. y Metzler, M. (2007). Novel oxidative metabolites of the mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, pp: 307-316.
- Pfeiffer, E., Schmit, C., Burkhardt, B., Altemöller, M., Podlech, J. y Metzler, M. (2009). Glucuronidation of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in vitro: chemical structures of glucuronides and activities of human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Mycotoxin Research*, 25, pp: 3-10.
- Pollock, G.A., DiSabatino, C.E., Heimsch, R.C. y Coulombe, R.A. (1982). The distribution, elimination, and metabolism of 14C-alternariol monomethyl ether. *Journal of Environmental Sciences of Health*, B17, pp: 109-124.
- Sauer, D.B., Seitz, L.M., Burroughs, R., Moher, H.E. y West, J.L. (1978). Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 26, pp: 1380-1383.
- Schrader, T.J., Cherry, W., Soper, K., Langlois, I. y Vijay, H.M. (2001). Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames *Salmonella* test. *Teratogenic Carcinogenic, Mutagenic*, 21, pp: 261-274.
- Schuchardt, S., Ziemann, C. y Hansen, T. (2014). Combined toxicokinetic and in vivo genotoxicity study on *Alternaria* toxins. EFSA supporting publication 2014, EN-679, pp: 130.
- Scoot, P.M., Zhao, W., Feng, S. y Lau, B.P. (2012). *Alternaria* toxins alternariol and alternariol monomethyl ether in grain foods in Canada. *Mycotoxin Research*, 28, pp: 261-266.
- Smith, E.R., Fredrickson, T.N. y Hadidian, Z. (1968). Toxic effects of the sodium and the N,N'-dibenzylethylenediamine salts of tenuazonic acid (NSC-525816 and NSC-82260). *Cancer Chemother*, Rep.52, pp: 579-585.
- Solhaug, A., Vines, L.L., Ivanova, L., Spilsberg, B., Holme, J.A., Pestka, J., Collins, A. y Eriksen, G.G. (2012). Mechanisms involved in alternariol-induced cell cycle arrest. *Mutation Research*, 738-739, pp: 1-11.
- Soriano, J.M. (2007). Micotoxinas: generalidades". En libro: *Micotoxinas en alimentos*. Díaz de Santos (Ed.). Madrid, España.
- Tiessen, C., Fehr, M., Schwarz, C., Baechler, S., Domnanich, K., Böttler, U., Pahlke, G. y Marko, D. (2013). Modulation of the cellular redox status by the *Alternaria* toxins alternariol and alternariol monomethyl ether. *Toxicology Letters*, 216, pp: 23-30.
- Valtonen, V. (2017). Clinical Diagnosis of the Dampness and Mold Hypersensitivity Syndrome: Review of the Literature and Suggested Diagnostic Criteria. *Frontiers Immunology*, 8 (951), pp: 1-6.

- Vieira, R., Veloso, J., Alfonso, A. y Rodrigues, A. (2006). Cutaneous alternariosis in a liver transplant recipient. *Revista Iberoamericana de Micrología*, 23, pp: 107-109.
- Visconti, A., Logrieco, A. y Bottalico, A. (1986). Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in olives—their production and possible transfer into the oil. *Food Additives & Contaminants*, 3, pp: 323–330.
- Wollenahupt, K., Schneider, F. y Tiemann, U. (2008). Influence of alternariol (AOH) on regulator proteins of cap-dependent translation in porcine endometrial cells. *Toxicology Letters*, 182, pp: 57-62.
- Woodey, M.A. y Chu, F.S. (1992). Toxicology of *Alternaria* mycotoxins. En libro: *Alternaria Biology, plant diseases and metabolites*. Chełkowski, J. and Visconti, A. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 409-434.
- Yekeler, H., Bitmiş, K., Özçelik, N., Doymaz, M.Z. y Calta, M. (2001). Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy. *Toxicological Pathology*, 29, pp: 492-497.

### **Toxinas de *Fusarium* (Eniáticas y Nivalenol)**

- EFSA (2013). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Scientific opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. *EFSA Journal*, 11 (6): 3262.
- EFSA (2014a). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Scientific opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA Journal*, 12 (12): 3916.
- EFSA (2014b). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Scientific opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal*, 12 (8): 3802.
- EFSA (2014c). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Evaluation of the increase of risk for public health related to a possible temporary derogation from the maximum level of deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins for maize and maize products. *EFSA Journal*, 12 (5).
- EFSA (2017). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Appropriateness to set a group health based guidance value for nivalenol and its modified forms. *EFSA Journal*, 15 (4).
- Fraeyman, S., Croubels, S., Devreese, M. y Antoniseen, G. (2017). Emerging *Fusarium* and *Alternaria* Mycotoxins: Occurrence, Toxicity and Toxicokinetics. *Toxins*, 9 (7), pp: 228.
- Ivanova, L., Fæste, C.K. y Uhlig, S. (2011). *In vitro* phase I metabolism of the depsipeptide enniatin B. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400 (9), pp: 2889-2901.
- Juan, C., Covarelli, L., Beccari, G., Colasante, V. y Mañes, J. (2016). Simultaneous analysis of twenty-six mycotoxins in durum wheat grain from Italy. *Food Control*, 62, pp: 322-329.
- Le Hégarat, L., Takakura, N., Simar, S., Nesslany, F. y Fessard, V. (2014). The *in vivo* genotoxicity studies on nivalenol and deoxynivalenol. *EFSA Supporting Publications*, 11 (11): 697E.
- Maranghi, F., Tassinari, R., Narciso, L., Tait, S., Rocca, C.L., Felice, G.D., Butteroni, C., Corinti, S., Barletta, B., Cordelli, E., Pacchierotti, F., Eleuteri, P., Villani, P., Hegarat, L. L., Fessard, V. y Reale, O. (2018). *In vivo* toxicity and genotoxicity of beauvericin and enniatins. Combined approach to study *in vivo* toxicity and genotoxicity of mycotoxins beauvericin (BEA) and enniatin B (ENNB). *EFSA Supporting Publications*, 15 (5).
- Meca, G., Zinedine, A., Blesa, J., Font, G. y Manes, J. (2010). Further data on the presence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins, fusaproliferin and beauvericin in cereals available on the Spanish markets. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (5), pp: 1412-1416.
- Meca, G., Sospedra, I., Valero, M.A., Manes, J., Font, G. y Ruiz, M.J. (2011). Antibacterial activity of the enniatin B, produced by *Fusarium tricinctum* in liquid culture, and cytotoxic effects on Caco-2 cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 21 (7), pp: 503-512.
- Moretti, A., Pascale, M. y Logrieco, A.F. (2018). Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. *Trends in Food Science & Technology*. doi:10.1016/j.tifs.2018.03.008.
- Poapolathep, A., Nagata, T., Suzuki, H., Kumagai, S. y Doi, K. (2003). Development of early apoptosis and changes in lymphocyte subsets in lymphoid organs of mice orally inoculated with nivalenol. *Experimental and Molecular Pathology*, 75 (1), pp: 74-79.

- Prosperini, A., Meca, G., Font, G. y Ruiz, M.J. (2013). Bioaccessibility of enniatins A, A(1), B, and B(1) in different commercial breakfast cereals, cookies, and breads of Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (2), pp: 456-461.
- Rodríguez-Carrasco, Y., Heilos, D., Richter, L., Sussmuth, R.D., Heffeter, P., Sulyok, M., Kenner, L., Berger, W. y Dornetshuber-Fleiss, R. (2016). Mouse tissue distribution and persistence of the food-born fusariotoxins Enniatin B and Beauvericin. *Toxicology Letters*, 247, pp: 35-44.
- Sugita-Konishi, Y., Kubosaki, A., Takahashi, M., Park, B., Tanaka, T., Takatori, K., Hirose, M. y Shibutani, M. (2008). Nivalenol and the targeting of the female reproductive system as well as haematopoietic and immune systems in rats after 90-day exposure through the diet. *Food Additives and Contaminants*, 25 (9), pp: 1118-1127.
- Svingen, T., Lund Hansen, N., Taxvig, C., Vinggaard, A.M., Jensen, U. y Have Rasmussen, P. (2017). Enniatin B and beauvericin are common in Danish cereals and show high hepatotoxicity on a high-content imaging platform. *Environmental Toxicology*, 32 (5), pp. 1658-1664.

### Alcaloides de la pirrolizidina

- Boppré, M., Colegate, S.M., Edgar, J.A. y Fischer, O.W. (2008). Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids in Pollen and Drying-Related Implications for Commercial Processing of Bee Pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5 (14), pp: 5662-5672.
- Codex (2018). *Codex Alimentarius* Commission. Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the GSCTFF. CF/12 INF/1.
- Copple, B.L., Ganey, P.E. y Roth, R.A. (2003). Liver inflammation during monocrotaline hepatotoxicity. *Toxicology*, 190 (3), pp: 155-169.
- Crews, C. (2013). Methods for analysis of pyrrolizidine alkaloids Natural Products. *Springer*, pp: 1049-1068.
- Dusemund, B., Nowak, N., Sommerfeld, C., Lindtner, O., Schafer, B. y Lampen, A. (2018). Risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food of plant and animal origin. *Food and Chemical Toxicology*, 115, pp: 63-72.
- Edgar, J.A., Roeder, E. y Molyneux, R.J. (2002). Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: a potential threat to health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (10), pp: 2719-2730.
- Edgar, J.A., Molyneux, R.J. y Colegate, S.M. (2014). Pyrrolizidine alkaloids: potential role in the etiology of cancers, pulmonary hypertension, congenital anomalies, and liver disease. *Chemical Research in Toxicology*, 28 (1), pp: 4-20.
- EFSA (2007). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Opinion of the Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to pyrrolizidine alkaloids as undesirable substances in animal feed. *EFSA Journal*, 5 (5): 447.
- EFSA (2011). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Scientific opinion on pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*, 9 (11): 2406.
- EFSA (2016). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population. *EFSA Journal*, 14 (8).
- EFSA (2017). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA Journal*, 15 (7): e04908.
- Hessel, S., Gottschalk, C., Schumann, D., These, A., Preiss-Weigert, A. y Lampen, A. (2014). Structure–activity relationship in the passage of different pyrrolizidine alkaloids through the gastrointestinal barrier: ABCB1 excretes heliotrine and echimidine. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58 (5), pp: 995-1004.
- Kakar, F., Akbarian, Z., Leslie, T., Mustafa, M.L., Watson, J., van Egmond, H.P., Omar, M.F. y Mofleh, J. (2010). An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in western Afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Toxicology*, 2010: 313280.
- Kempf, M., Wittig, M., Schonfeld, K., Cramer, L., Schreier, P. y Beuerle, T. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in food: downstream contamination in the food chain caused by honey and pollen. *Food Additives & Contaminants, Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 28 (3), pp: 325-331.

- Merz, K.H. y Schrenk, D. (2016). Interim relative potency factors for the toxicological risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food and herbal medicines. *Toxicology Letters*, 263, pp: 44-57.
- Mulder, P.P.J., Sánchez, P.L., These, A., Preiss-Weigert, A. y Castellari, M. (2015). Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in food. *EFSA Supporting Publications*, 12 (8), 859E.
- NTP (2003). National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of riddelliine (CAS No. 23246-96-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). National Toxicology Program Technical Report Series (508), 1.
- OMS (2016). Organización Mundial de la salud. Pyrrolizidine alkaloids. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Eightieth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, pp: 65-80.
- Yang, M., Ruan, J., Gao, H., Li, N., Ma, J., Xue, J., Ye, Y., Fu, P.P.-C., Wang, J. y Lin, G. (2017). First evidence of pyrrolizidine alkaloid N-oxide-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome in humans. *Archives of Toxicology*, 91 (12), pp: 3913-3925.
- Zhu, L., Xue, J., Xia, Q., Fu, P.P. y Lin, G. (2017). The long persistence of pyrrolizidine alkaloid-derived DNA adducts in vivo: kinetic study following single and multiple exposures in male ICR mice. *Archives of Toxicology*, 91 (2), pp: 949-965.



# Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el riesgo asociado a la presencia de alcaloides de la pirrolizidina en polen destinado al consumo humano

## Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Montaña Cámara Hurtado, María Pilar Conchello Moreno, Álvaro Daschner, Ramón Estruch Riba, Rosa María Giner Pons, María Elena González Fandos, Susana Guix Arnau, Ángeles Jos Gallego, Jordi Mañes Vinuesa, Olga Martín Belloso, María Aránzazu Martínez Caballero, José Alfredo Martínez Hernández, Alfredo Palop Gómez, David Rodríguez Lázaro, Gaspar Ros Berrueto, Carmen Rubio Armendáriz, María José Ruiz Leal, Jesús Ángel Santos Buelga, Pau Talens Oliag, Josep Antoni Tur Mari

## Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2018-006

Documento aprobado por la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico en su sesión plenaria de 28 de noviembre de 2018

## Grupo de trabajo

Ángeles Jos Gallego (Coordinadora)  
Rosa María Giner Pons  
Carmen Rubio Armendáriz

## Resumen

Los alcaloides de la pirrolizidina son toxinas naturales, producto del metabolismo secundario de las plantas, que se producen como mecanismo de defensa frente a herbívoros. Su estructura química está basada en un anillo de pirrolizidina, que consiste en dos anillos fusionados con un átomo de nitrógeno como puente. Se conocen cerca de 600 de estos alcaloides, el 95 % se encuentran en cinco familias de plantas: Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae, Orchidaceae y Apocynaceae.

Los alcaloides de la pirrolizidina tienen un perfil común de toxicidad, los principales son diversos grados de daño hepático (necrosis hepatocelular centrolobular) y enfermedad venooclusiva. Además, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) los ha clasificado como "posiblemente carcinógenos para el ser humano" (grupo 2B). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha elaborado dictámenes sobre distintos aspectos de estos alcaloides en 2011, 2016 y 2017 y la Comisión Europea ha seleccionado provisionalmente 17 de ellos como relevantes en alimentos.

A falta de un límite legal que permita a las autoridades competentes en inspección tomar decisiones basadas en dicho límite ante la detección de estos alcaloides en el polen, se solicita a la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) que realice una evaluación del riesgo asociado a la presencia de alcaloides de la pirrolizidina en polen destinado al consumo humano que sirva de base a dicha toma de decisiones.

Conforme a los datos disponibles actualmente y la estimación realizada teniendo en cuenta todas las incertidumbres identificadas en el proceso de evaluación de riesgos, la ingesta de alcaloides de la pirrolizidina a través del consumo de polen puede dar lugar a riesgos crónicos en la población española. No se considera probable, sin embargo, la aparición de riesgos agudos. Para llevar a

cabo una evaluación del riesgo más realista se recomienda realizar estudios de consumo de polen en la población española. Igualmente, se estima la conveniencia de establecer límites legales en cuanto al contenido de alcaloides de la pirrolizidina con el fin de limitar la exposición.

### **Palabras clave**

Alcaloides, pirrolizidina, polen.

## **Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) concerning the risk associated with the presence of pyrrolizidine alkaloids in pollen intended for human consumption**

### **Abstract**

Pyrrolizidine alkaloids are natural toxins, the product of the secondary metabolism of plants which are produced as a defence mechanism against herbivores. Their chemical structure is based on a pyrrolizidine ring, consisting of two rings fused together by a bridge nitrogen atom. There are approximately 600 known alkaloids, 95 % of which are found in five plant families: Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae, Orchidaceae and Apocynaceae.

The pyrrolizidine alkaloids have a common toxicity profile, the main ones being various degrees of liver damage (centrolobular hepatocellular necrosis) and veno occlusive disease. In addition, the International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified them as “possibly carcinogenic to humans” (group 2B). The European Food Safety Authority (EFSA) issued opinions on different aspects of these alkaloids in 2011, 2016 and 2017, and the European Commission has provisionally selected 17 of these as relevant in food.

In the absence of a legal limit which enables the competent inspection authorities to make decisions based on this limit in the event of the detection of these alkaloids in pollen, the Section of Food Safety and Nutrition of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) is asked to conduct an assessment of the risk associated with the presence of pyrrolizidine alkaloids in pollen intended for human consumption to serve as a basis for taking such decisions.

According to currently available data and the estimations made, and considering all the uncertainties identified in the risk assessment process, the intake of pyrrolizidine alkaloids through the consumption of pollen may lead to chronic risk for the Spanish population. However, the appearance of acute risks is not considered likely. In order to conduct a more realistic risk assessment, studies of pollen consumption among the Spanish population are recommended. Similarly, the establishment of legal limits for pyrrolizidine alkaloid content is considered to be appropriate in order to limit the risk of exposure.

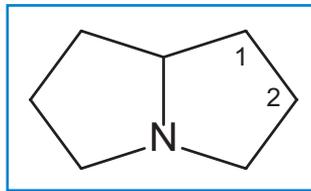
### **Key words**

Alkaloids, pyrrolizidine, pollen.

## 1. Introducción

Los alcaloides de la pirrolizidina (AP) son un amplio grupo de toxinas producto del metabolismo secundario de las plantas, que los producen como mecanismo de defensa frente a herbívoros. Se ha estimado que aproximadamente 6 000 especies botánicas en todo el mundo pueden contener AP (Dusemund et al., 2018). La distribución botánica de los AP se limita a varias familias de Angiospermas no relacionadas que pertenecen principalmente a las familias Asteraceae (géneros *Senecio*, *Eupatoria*, *Tussilago*), Boraginaceae (*Echium*, *Heliotropium*, *Symphytum*, *Trichodesma*), Fabaceae (*Crotalaria*), y algunos géneros de Apocynaceae y Orchidaceae. Además, se encuentran en un número reducido de especies de otras familias tales como Ranunculaceae, Convolvulaceae, Celastraceae, Proteaceae y Poaceae (Ober y Kaltenecker, 2009).

La estructura química de estos alcaloides está basada en un anillo de pirrolizidina, que consiste en dos anillos fusionados con un átomo de nitrógeno compartido (Figura 1) (AECOSAN, 2018). Existen dos grupos principales, los AP 1,2-insaturados y los 1,2-saturados, dependiendo de la existencia o no de un doble enlace entre las posiciones 1 y 2 del anillo. Hasta la fecha, se conocen aproximadamente 600 AP diferentes. No obstante, son los 1,2-insaturados los que presentan toxicidad debido, principalmente, a que estos compuestos una vez en el organismo, son transformados a pirroles de elevada reactividad. Son éstos por tanto en los que se centra la evaluación de riesgos.



**Figura 1.** Estructura básica del anillo de pirrolizidina

Los alcaloides de la pirrolizidina tienen un perfil común de toxicidad, los principales son diversos grados de daño hepático (necrosis hepatocelular centrolobular) y enfermedad veno-oclusiva. Además, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) los ha clasificado como “posiblemente carcinógenos para el ser humano” (grupo 2B) (IARC, 1976).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha elaborado dictámenes sobre distintos aspectos de estos alcaloides en 2011, 2016 y 2017 y la Comisión Europea ha seleccionado provisionalmente 17 de ellos como relevantes en alimentos.

A falta de un límite legal que permita a las autoridades competentes en inspección tomar decisiones basadas en dicho límite ante la detección de estos alcaloides en el polen, se ha solicitado a la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) que realice una evaluación del riesgo asociado a la presencia de alcaloides de la pirrolizidina en polen destinado al consumo humano que sirva de base a dicha toma de decisiones.

## 2. Identificación y caracterización del peligro

Tal y como se ha descrito anteriormente, los AP son sustancias naturales producidas por distintas especies de plantas. De hecho éstas producen mezclas de AP que pueden estar en forma de base libre o de N-óxido. Estos últimos, una vez ingeridos se pueden reducir rápidamente en el aparato gastrointestinal y, en la mayoría de condiciones, su toxicidad *in vivo* es sólo levemente más baja que la base libre (Stegelmeier et al., 2016).

Con respecto a su toxicocinética, se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal. Esta absorción es muy elevada, como demuestran estudios realizados en ratones, en los que se encontró que la absorción en el tracto gastrointestinal tras la administración de una dosis oral de riddellina fue del 100 % del alcaloide suministrado (EFSA, 2011). Una vez que estos compuestos son incorporados al organismo, son transformados por tres rutas principalmente, hidrólisis, N-oxidación y deshidrogenación de la pirrolizidina por el citocromo P450, produciendo esta última vía pirroles de elevada reactividad. El grado de formación de los metabolitos pirrólicos está influenciado por la inducción o inhibición de las oxidasas de función mixta en el hígado, pero la relación entre la tasa de metabolismo y la toxicidad es incierta (IPCS INCHEM, 1988). La eliminación de este tipo de compuestos es muy rápida, siendo la orina la principal ruta de excreción (EFSA, 2011).

La toxicidad de los AP es debida a los derivados pirrólicos formados por las oxidasas de función mixta hepáticas. Éstos actúan como agentes alquilantes y pueden reaccionar con enzimas y ácidos nucleicos, siendo responsables de la hepatotoxicidad aguda y crónica, genotoxicidad y carcinogenicidad. Dañan las células endoteliales de las venas centrotubulares del hígado, provocando un engrosamiento de sus paredes y una obstrucción no trombótica de las venas hepáticas, lo que se conoce como enfermedad veno-oclusiva hepática o síndrome de obstrucción sinusoidal hepática (EFSA, 2017) (Letsyo et al., 2017), pudiendo producir cirrosis y fallo hepático. Los derivados pirrólicos pueden ser también agentes carcinogénicos (de hecho están clasificados en el grupo 2B de la IARC). Esto se debe a que son capaces de inducir modificaciones en el ADN, llegando a ser también agentes mutágenos (Stegelmeier et al., 2016).

En relación a valores guía toxicológicos para AP, el Panel CONTAM de EFSA no ha podido establecer una dosis de referencia aguda (ARfD). La limitada información disponible sobre casos de intoxicaciones humanas permitió identificar la menor dosis conocida en aproximadamente 2 mg/kg p.c./día (1-3 mg/kg p.c./día) asociada a efectos agudos/a corto plazo (EFSA, 2017). Ésta está basada en el caso de una niña de 6 meses que recibió una dosis diaria de aproximadamente 0,8-1,7 mg AP/kg p.c. durante 2 semanas y fue diagnosticada con enfermedad veno-oclusiva hepática y el caso de un niño de 2 meses al que se le administró una dosis aproximada de 3 mg/kg p.c. durante 4 días con un desenlace fatal.

Con respecto a los efectos crónicos, el Panel CONTAM de EFSA (2017) ha actualizado el punto de referencia (RP) para llevar a cabo la evaluación del riesgo crónico. Ha seleccionado la BMDL<sub>10</sub> de 237 µg/kg p.c./día derivada de la incidencia de hemangiosarcoma hepático en ratas hembra expuestas a riddellina, para realizar la evaluación del riesgo de los AP 1,2-insaturados asumiendo la misma potencia para todos ellos. Previamente se había venido usando la BMDL<sub>10</sub> de 70 µg/kg p.c./día para la lasiocarpina. Ambos AP están clasificados entre los más tóxicos. El Panel concluyó que el cambio de RP mantiene la naturaleza conservadora de las evaluaciones de riesgos previas.

### 3. Evaluación de la exposición

#### 3.1 Contenido de AP en polen

Actualmente, el Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios (UE, 2006) y sus posteriores modificaciones, no establece límite máximo para AP.

En los dictámenes de EFSA los datos disponibles sobre el contenido de AP en polen son escasos. Así, EFSA (2016) recoge los siguientes datos obtenidos tras el análisis de 41 muestras de polen (Tabla 1):

| <b>Tabla 1.</b> Contenido de AP en muestras de polen |                          |                                 |   |
|--|--------------------------|---------------------------------|---|
| <b>Variable</b>                                      | <b>Media<br/>(µg/kg)</b> | <b>Percentil 90<br/>(µg/kg)</b> | <b>Percentil 95<br/>(µg/kg)<sup>1</sup></b> |
| Límite inferior (LB)                                 | 235                      | 967                             | -   |
| Media (MB)   | 244                      | 970                             | -   |
| Límite superior (UB)                                 | 253                      | 974                             | -   |

<sup>1</sup>No se pudo calcular al ser el número de muestras <60. **Fuente:** (EFSA, 2016).

Con respecto al contenido de AP en polen producido en España, se dispone de datos de un total de 138 muestras obtenidas los años 2011 (1 muestra), 2012 (14), 2013 (20), 2014 (15), 2015 (26), 2016 (43) y 2017 (19) cuya estadística descriptiva básica en conjunto se recoge a continuación (Tabla 2):

| <b>Tabla 2.</b> Estadística descriptiva básica de los AP analizados en muestras de polen español |                 |
|--|-----------------|
| N  | 138             |
| Media (µg/kg)  | 988,55          |
| Mediana (µg/kg)  | 583,50          |
| Intervalo confianza 95 %   | 742,28-1 234,80 |
| Mínimo   | 0,00            |
| Máximo   | 12 536,00       |
| Desviación estándar  | 1 476,01        |
| Percentil 90   | 1 890,70        |
| Percentil 95   | 4 051,35        |

Estos valores hacen referencia a la suma del total de AP cuantificados en cada muestra, pudiendo variar el número y/o tipo de AP analizado.

### 3.2 Consumo de polen

El polen se consume como complemento alimentario por su alto valor nutricional (Cornara et al., 2017) y porque se le atribuyen propiedades antifúngicas, antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias, inmunoestimulantes, etc. (Komosinska-Vassev et al., 2015). No obstante, sus niveles de ingesta actual son desconocidos. En la “EFSA Comprehensive European Food Consumption Database” no hay registrados datos específicos de consumo de polen, sino para otro tipo de complementos (complementos de vitaminas, de minerales, de mezclas, misceláneos o nutracéuticos, etc.) cuyo nivel de ingesta puede diferir en gran medida de la del polen (EFSA, 2018). Según EFSA (2016), en la base de datos de consumo tan sólo figuran 32 entradas. Por otro lado, la encuesta ENALIA2 (Encuesta Nacional de Alimentación en la población adulta, mayores y embarazadas) no recoge datos de consumo de polen en la población española (AECOSAN, 2017).

Según Komosinska-Vassev et al. (2015) la dosis diaria recomendada de polen en adultos es de 20-40 g y en niños de 7,5-15 g. El tiempo de tratamiento suele ser 1-3 meses pero se puede repetir 2-4 veces/año.

### 3.3 Estimación de la Ingesta Diaria de Exposición (IDE)

En 2016 EFSA publicó un informe científico en relación a la exposición dietética a AP en la población europea. En este informe, para estimar la exposición crónica se utilizaron los límites inferior y superior de los contenidos de AP encontrados (LB= 235 y UB= 253 µg/kg) obteniéndose valores de entre 0,7 y 12 ng/kg p.c./día. Para estimar la exposición aguda se utilizaron los datos del percentil 90 (LB-P90= 967 µg/kg, UB-P90= 974 µg/kg) obteniéndose valores de entre 2,8 y 44 ng/kg p.c./día. En ambos casos se utilizaron datos del grupo “sólo consumidores”, es decir el grupo con mayor nivel de exposición.

Aunque en el informe no se recoge el dato de consumo de polen utilizado para derivar la IDE, asumiendo un adulto de 70 kg p.c., éste oscilaría entre los 0,2-3 g de polen al día. Si en lugar de usar estos datos de ingesta se utilizan los indicados por Komosinska-Vassev et al. (2015) los resultados obtenidos en adultos serían más elevados (Tabla 3).

| <b>Tabla 3.</b> Estimación de la IDE en función del contenido de AP en polen indicado en EFSA (2016) y el consumo indicado en Komosinska-Vassev et al. (2015) |   |                                 |                             |
|---|---|---------------------------------|-----------------------------|
| <b>Exposición</b>   | <b>Contenido de AP en polen (LB-UB µg/kg)</b> | <b>Consumo de polen (g/día)</b> | <b>IDE (ng/kg p.c./día)</b> |
| Crónica   | 235-253                                       | 20                              | 67,14-72,30                 |
|   |   | 40                              | 134,28-144,60               |
| Aguda   | 967-974                                       | 20                              | 276,30-278,30               |
|   |   | 40                              | 552,60-556,60               |

Teniendo en cuenta el contenido de AP de polen español, y considerando un peso corporal de 70 kg para adultos y 12 kg para niños pequeños (1-3 años), la IDE calculadas se muestran en las

tablas 4 y 5. EFSA (2012) considera que la evaluación de la exposición en adultos y niños pequeños (1-3 años) en el marco de una evaluación de riesgos es suficiente ya que incluiría la exposición de niños de mayor edad y adolescentes, ya que probablemente serían datos intermedios entre ambos grupos de población.

**Tabla 4.** Estimación de las IDE en adultos (70 kg p.c.) teniendo en cuenta los contenidos de AP de polen español y el consumo calculado a partir de EFSA (2016)

| Exposición | Contenido de AP en polen (µg/kg) | Consumo de polen (g/día) | IDE (ng/kg p.c./día) |
|------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------|
| Crónica    | Media: 988,55                    | 0,2                      | 2,82                 |
|            |                                  | 3,2                      | 45,20                |
|            | Mediana: 583,50                  | 0,2                      | 1,67                 |
|            |                                  | 3,2                      | 26,70                |
| Aguda      | Percentil 90: 1 890,70           | 0,2                      | 5,40                 |
|            |                                  | 3,2                      | 86,43                |
|            | Percentil 95: 4 051,35           | 0,2                      | 11,60                |
|            |                                  | 3,2                      | 185,20               |

**Tabla 5.** Estimación de las IDE en niños (1-3 años) y adultos teniendo en cuenta los contenidos de AP de polen español y el consumo indicado en Komosinska-Vashev et al. (2015)

| Exposición | Contenido de AP en polen (µg/kg) | Consumo de polen (g/día) | IDE (ng/kg p.c./día) |
|------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------|
| Crónica    | Media: 988,55                    | 7,5 (niños)              | 617,84               |
|            |                                  | 15 (niños)               | 1 235,70             |
|            |                                  | 20 (adultos)             | 282,44               |
|            |                                  | 40 (adultos)             | 564,88               |
|            | Mediana: 583,50                  | 7,5                      | 364,70               |
|            |                                  | 15                       | 729,40               |
|            |                                  | 20                       | 166,71               |
|            |                                  | 40                       | 333,42               |

**Tabla 5.** Estimación de las IDE en niños (1-3 años) y adultos teniendo en cuenta los contenidos de AP de polen español y el consumo indicado en Komosinska-Vassev et al. (2015)

| Exposición | Contenido de AP en polen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Consumo de polen ( $\text{g}/\text{día}$ ) | IDE ( $\text{ng}/\text{kg p.c.}/\text{día}$ ) |
|------------|--|--|---|
| Aguda      | Percentil 90: 1 890,70                               | 7,5  | 1 181,70                                      |
|            |  | 15   | 2 363,40                                      |
|            |  | 20   | 540,20  |
|            |  | 40   | 1 080,40                                      |
|            | Percentil 95: 4 051,35                               | 7,5  | 2 532,09                                      |
|            |  | 15   | 5 064,18                                      |
|            |  | 20   | 1 157,53                                      |
|            |  | 40   | 2 315,06                                      |

## 4. Caracterización del riesgo

### 4.1 Efectos agudos

Según EFSA (2017), en base a la incertidumbre en los niveles de AP y en la severidad de sus efectos, la exposición a niveles de AP 100 veces menores a la dosis de referencia aguda (1-3 mg/kg p.c./día) se puede asociar con riesgo agudo/a corto plazo. Dadas las IDE estimadas (2,8-44 ng/kg p.c./día), EFSA consideró que el consumo de complementos basados en polen no posee riesgos agudos para la salud humana. Lo mismo se podría decir incluso con un consumo de 40 g/día de polen.

Si se tienen en cuenta los datos de contenido de AP en polen español, las correspondientes IDE de las tablas 4 y 5, y la ARfD de 1-3 mg/kg p.c./día, la caracterización del riesgo de efectos agudos sería la siguiente (Tabla 6):

**Tabla 6.** Caracterización de riesgos agudos por consumo de polen español con AP

| Contenido de AP en polen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Consumo de polen ( $\text{g}/\text{día}$ ) | IDE ( $\text{ng}/\text{kg p.c.}/\text{día}$ ) | % ARfD (1 mg/kg p.c./día) | % ARfD/100 (10 $\mu\text{g}/\text{kg p.c.}/\text{día}$ ) |
|--|--|---|---------------------------|--|
| Percentil 90:<br>1 890,70                            | 0,2  | 5,40 (adultos)                                | 0,00054                   | 0,054  |
|  | 3,2  | 86,43 (adultos)                               | 0,00864                   | 0,86   |
|  | 7,5  | 1 181,70 (niños)                              | 0,12                      | 11,82  |
|  | 15,0                                       | 2 363,40 (niños)                              | 0,24                      | 23,63  |
|  | 20,0                                       | 540,20 (adultos)                              | 0,05                      | 5,40   |
|  | 40,0                                       | 1 080,40 (adultos)                            | 0,11                      | 10,80  |

**Tabla 6.** Caracterización de riesgos agudos por consumo de polen español con AP

| Contenido de AP en polen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Consumo de polen ( $\text{g}/\text{día}$ ) | IDE ( $\text{ng}/\text{kg p.c.}/\text{día}$ ) | % ARfD ( $1 \text{ mg}/\text{kg p.c.}/\text{día}$ ) | % ARfD/100 ( $10 \mu\text{g}/\text{kg p.c.}/\text{día}$ ) |
|--|--|---|---|---|
| Percentil 95:<br>4 051,35                            | 0,2  | 11,60 (adultos)                               | 0,00116   | 0,12  |
|  | 3,2  | 185,20 (adultos)                              | 0,01852   | 1,85  |
|  | 7,5  | 2 532,09 (niños)                              | 0,25  | 25,32   |
|  | 15,0                                       | 5 064,18 (niños)                              | 0,50  | 50,64   |
|  | 20,0                                       | 1 157,53 (adultos)                            | 0,11  | 11,57   |
|  | 40,0                                       | 2 315,06 (adultos)                            | 0,23  | 23,15   |

En ningún caso la IDE supera la ARfD ni el margen de seguridad considerado, por lo que la exposición aguda a AP a través del consumo de polen no es probable que constituya un riesgo de padecer efectos tóxicos agudos. Estos resultados coinciden con la previsión de EFSA (2017).

#### 4.2 Efectos crónicos

El Comité Científico de EFSA concluyó que para sustancias que son tanto genotóxicas como carcinogénicas, un margen de exposición (*margin of exposure*, MOE)  $\geq 10\ 000$ , basado en una  $\text{BMDL}_{10}$  obtenida de un estudio animal, y teniendo en cuenta las incertidumbres en la interpretación, sería de baja preocupación desde el punto de vista de la salud pública (EFSA, 2005). Utilizando el nuevo RP ( $\text{BMDL}_{10}$  de  $237 \mu\text{g}/\text{kg p.c.}/\text{día}$  para riddellina) y calculando el MOE, concluyó que hay una posible preocupación para la salud humana relativa a la exposición a AP, en particular para los consumidores frecuentes y elevados de té e infusiones de hierbas. Con respecto al consumo de complementos de polen no derivó ninguna conclusión.

Si se toma como dato el valor de IDE crónica establecida en EFSA (2016) de  $0,7\text{-}12 \text{ ng}/\text{kg p.c.}/\text{día}$  se obtendría un MOE de entre  $338\ 571,43$  y  $19\ 750,00$ , en ambos casos  $>10\ 000$  por lo que la presencia de AP en polen no sería un motivo de preocupación. Si se usa la IDE calculada teniendo en cuenta una ingesta de  $20 \text{ g}/\text{día}$  de polen el MOE obtenido oscila entre  $3\ 529,93$  y  $3\ 278,00$ , es decir  $<10\ 000$  y por tanto sí habría preocupación para la salud.

No obstante, hay que decir que EFSA tal y como se ha comentado, realiza una evaluación del riesgo conservadora asumiendo la  $\text{BMDL}_{10}$  de riddellina para la totalidad de los AP presentes en el polen, que son una mezcla que puede o no contener riddellina y puede ser que tengan una potencia tóxica inferior. En este sentido, Chen et al. (2017) propusieron refinar los datos de IDE y MOE teniendo en cuenta un factor de potencia relativa aplicado a los AP. Los factores calculados fueron  $1; 0,9; 0,05; 0,23; 0,03$  y  $0,02$  para lasiocarpina, riddellina, monocrotalina, clivorina, senkirkina y simfitina, respectivamente. No obstante, EFSA (2017) no consideró adecuado utilizar el enfoque de Chen et al. (2017) y se reafirmó en la naturaleza conservadora de su evaluación del riesgo.

Si se tienen en cuenta los datos de contenido de AP en polen español, las correspondientes IDE de las tablas 4 y 5, y la  $BMDL_{10}$  de 237  $\mu\text{g}/\text{kg p.c.}/\text{día}$  para riddellina, la caracterización del riesgo de efectos crónicos en base al MOE ( $\text{MOE} = BMDL_{10}/\text{IDE}$ ) sería la siguiente (Tabla 7):

**Tabla 7.** Caracterización de riesgos crónicos por consumo de polen español con AP

| Contenido de AP en polen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Consumo de polen ( $\text{g}/\text{día}$ ) | IDE ( $\text{ng}/\text{kg pc día}$ ) | ¿Riesgo?<br>MOE $\geq$ 10 000 No<br>MOE <10 000 Sí |
|--|--|--------------------------------------|--|
| Media: 988,55  | 0,2 (adultos)                              | 2,82                                 | 84 042,53 No                                       |
|  | 3,2 (adultos)                              | 45,20                                | 5 243,36 Sí  |
|  | 7,5 (niños)                                | 617,84                               | 383,60 Sí  |
|  | 15 (niños)                                 | 1 235,70                             | 191,80 Sí  |
|  | 20 (adultos)                               | 282,44                               | 839,12 Sí  |
|  | 40 (adultos)                               | 564,88                               | 419,56 Sí  |
| Mediana: 583,50                                      | 0,2  | 1,67                                 | 141 916,17 No                                      |
|  | 3,2  | 26,70                                | 8 876,40 Sí  |
|  | 7,5  | 364,70                               | 649,85 Sí  |
|  | 15   | 729,40                               | 324,92 Sí  |
|  | 20   | 166,71                               | 1 421,63 Sí  |
|  | 40   | 333,42                               | 710,81 Sí  |

En este caso, tanto en adultos como en niños y considerando los posibles escenarios de exposición planteados, en la mayoría de los supuestos hay probabilidad de que se produzcan riesgos crónicos. Tan sólo cuando se considera una ingesta de 0,2 g/día de polen (el valor inferior calculado a partir de los datos de EFSA (2016)) no hay probabilidad de riesgos crónicos.

Dado que se conoce la  $BMDL_{10}$  utilizada como RP en evaluación de efectos crónicos, y que un valor de  $\text{MOE} \geq 10\,000$  se considera un riesgo de baja preocupación para la salud, se puede estimar la IDE máxima que se espera que no produzca riesgos:

$$237 \mu\text{g}/\text{kg p.c.}/\text{día} / \text{IDE} = 10\,000$$

$$\text{IDE} = 0,0237 \mu\text{g}/\text{kg p.c.}/\text{día}$$

Asumiendo un individuo de 70 kg p.c. la IDE sería  $0,0237 \times 70 = 1,659 \mu\text{g AP}/\text{día}$ . Es decir, la ingesta máxima de AP que no daría lugar a riesgos crónicos sería 1,659  $\mu\text{g}/\text{día}$  (en principio considerando todas las fuentes de AP). Considerando que los AP proceden únicamente del polen, la cantidad que se puede consumir sin riesgo va a depender de su grado de contaminación.

## 5. Incertidumbres asociadas al proceso de evaluación del riesgo

### 5.1 En la caracterización del peligro

- EFSA (2017) indica la necesidad de disponer de más datos toxicológicos en relación a los AP más frecuentemente encontrados en alimentos. En particular, información sobre la toxicocinética, activación metabólica y potencia carcinógena de los AP lo que permitiría un refinamiento sustancial en la evaluación del riesgo.

### 5.2 En la evaluación de la exposición

Con respecto a la calidad de los datos de contenido de AP:

- El número de muestras de polen analizadas en EFSA (2016) es limitado (41).
- La variabilidad de los datos de contenido de AP en las muestras de polen español es muy alta (5,8 % 0-10 µg/kg; 8 % 11-100; 14,5 % 101-200; 18,8 % 201-500; 18,8 % 501-1 000; 25,4 % 1 001-2 000; 6,5 % 2 001-5 000; 2,2 % >5 001), con valores tan bajos como 0 y una muestra conteniendo hasta 12 536 µg/kg. Se han utilizado todos los datos.
- El Panel CONTAM de EFSA identificó una lista de 17 AP de relevancia para ser monitorizados tanto en alimentos como en piensos (EFSA, 2017). Estos AP son los siguientes: intermedina/licopsamina, intermedina-N-óxido/licopsamina-N-óxido, senecionina/senecivernina, senecionina-N-óxido/senecivernina-N-óxido, senecifilina, senecifilina-N-óxido, retrorsina, retrorsina-N-óxido, equimidina, equimidina-N-óxido, lasiocarpina, lasiocarpina-N-óxido y senkirina. No todos ellos han sido analizados en las muestras. Llama la atención que entre los 17 AP señalados por EFSA como relevantes no se haya incluido la riddellina, puesto que la caracterización del riesgo crónico se basa en la BMDL<sub>10</sub> de este AP en particular.
- El límite de detección (LOD) de la técnica utilizada (LC-MS/MS) no se ha proporcionado, tan sólo los límites de cuantificación (LOQ) y éstos varían para un mismo AP en función del año de realización del análisis.
- Algunos LOQ no son adecuados según EFSA, aunque se corresponden a AP no considerados entre los 17 de especial relevancia.
- EFSA (2017) recomendó desarrollar métodos analíticos más sensibles y selectivos para valorar la presencia de AP en alimentos y piensos y así disminuir la incertidumbre en la evaluación de la exposición.
- En relación al contenido de AP en muestras de polen español se podría seguir una aproximación más conservadora (peor escenario) en la que en lugar de usar un valor de 0 µg/kg cuando no se pueda cuantificar se utilice como contenido el LOD de la técnica aplicada para ese AP en cuestión (un contenido de AP <LOD no implica que no haya). No obstante, no se disponen de datos de LOD.

Con respecto al consumo de polen (estimación de la IDE):

- Aunque se conoce el dato de concentración de AP en las muestras utilizado en EFSA (2016) para derivar la IDE, no se especifica cuál ha sido el dato de consumo empleado. Realizándose el cálculo se obtiene un dato de ingesta poco realista en base a las recomendaciones de los fabricantes y de la bibliografía científica.

- No se dispone de datos reales de consumo de polen en la población española, por lo que para hacer los cálculos se emplea lo indicado en la bibliografía científica.

### 5.3 En la caracterización del riesgo

- Se realiza en base a la BMDL<sub>10</sub> de un AP concreto, riddellina, considerado entre los más tóxicos, el cual no tiene por qué estar presente en las muestras de polen, sobreestimándose por tanto el riesgo. De hecho, según EFSA (2017) para complementos alimentarios (extractos de plantas y complementos basados en polen) en general la principal contribución al total de AP procede de licopsamina, intermedina y sus N-óxidos.
- El cálculo del MOE asume un consumo diario del alimento en cuestión (polen) durante toda la vida, lo que puede sobreestimar el riesgo si no es éste el patrón de consumo seguido.

### Conclusiones del Comité Científico

Conforme a los datos disponibles actualmente y la estimación realizada teniendo en cuenta todas las incertidumbres identificadas en el proceso de evaluación de riesgos, la ingesta de AP a través del consumo de polen puede dar lugar a riesgos crónicos en la población española, salvo que se consideren consumos muy bajos. No se considera probable, sin embargo, la aparición de riesgos agudos. Para llevar a cabo una evaluación del riesgo más realista sería necesario contar con datos adicionales sobre la caracterización toxicológica de los AP individuales, así como realizar estudios de consumo de polen en la población española. Igualmente, se estima la conveniencia de establecer límites legales en cuanto al contenido de AP con el fin de limitar la exposición.

### Referencias

- AECOSAN (2017). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Encuesta ENALIA2. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/enalia\\_2.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/enalia_2.htm) [acceso: 13-12-18].
- AECOSAN (2018). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Alcaloides de pirrolizidina. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/PAs\\_ficha.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/PAs_ficha.pdf) [acceso: 13-12-18].
- Chen, L., Mulder, P.P.J., Louise, J., Peijnenburg, A., Wesseling, S. y Rietjens, I.M.C.M. (2017). Risk assessment for pyrrolizidine alkaloids detected in (herbal) teas and plant food supplements. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 86, pp: 292-302.
- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J. y Burlando, B. (2017). Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Frontiers in Pharmacology*, 8, pp: 412.
- Dusemund, B., Nowak, N., Sommerfeld, C., Lindtner, O., Schäfer, B. y Lampen, A. (2018). Risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food of plant and animal origin. *Food and Chemical Toxicology*, 115, pp: 63-72.
- EFSA (2005). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. *EFSA Journal*, 3 (10): 282, pp: 1-33.
- EFSA (2011). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*, 9 (11): 2406, pp: 1-134.
- EFSA (2012). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal*, 10 (3): 2579, pp: 1-32.

- EFSA (2016). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population. *EFSA Journal*, 14 (8): 4572, pp: 1-50.
- EFSA (2017). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Statement on the risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA Journal*, 15 (7): 4908, pp: 1-34.
- EFSA (2018). Comprehensive European Food Consumption Database. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en/food-consumption/comprehensive-database> [acceso: 13-12-18].
- IARC (1976). Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Pyrrolizidine alkaloids. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, Vol. 10), pp: 265-327. Disponible en: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono10.pdf> [acceso: 13-12-18].
- IPCS-INCHEM (1988). International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 80. Pyrrolizidine alkaloids. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc080.htm> [acceso: 13-12-18].
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L. y Olczyk, K. (2015). Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015 *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID: 297425. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/297425>. [acceso: 13-12-18].
- Letsyo, E., Jerz, G., Winterhalter, P. y Beuerle, T. (2017). Toxic pyrrolizidine alkaloids in herbal medicines commonly used in Ghana. *Journal of Ethnopharmacology*, 202, pp: 154-161.
- Ober, D. y Kaltenecker, E. (2009). Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 70, pp: 1687-1695.
- Stegelmeier, B.L., Colegate, S.M. y Brown, A.W. (2016). Dehydropyrrolizidine Alkaloid Toxicity, Cytotoxicity, and Carcinogenicity. *Toxins*, 8, pp: 356.
- UE (2006). Reglamento N° 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DO L 364 de 20 de diciembre de 2006, pp: 5-24.

## Colaboración

### **Balance de 15 años del Comité Científico como órgano de evaluación de riesgos alimentarios de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición**

Vicente Calderón Pascual, María de los Ángeles Capón García-Caro, Victorio José Teruel Muñoz, Eduardo Cantalejo González\* y Ricardo López Rodríguez

Área de Evaluación de Riesgos de la Subdirección General de Promoción de la Seguridad Alimentaria  
Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición  
Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social

\* Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A., S.M.E., M.P. (Tragsatec)

#### Resumen

El Comité Científico de la Agencia Española Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) es el órgano de evaluación de riesgos que tiene la función de proporcionar a la Agencia dictámenes científicos en materia de seguridad alimentaria, definir el ámbito de los trabajos de investigación necesarios para las funciones de la Agencia y coordinar los trabajos de los grupos de expertos que realicen actividades de evaluación de riesgos en el marco de las actuaciones de la Agencia.

Desde su constitución hace 15 años han pasado por el Comité Científico 74 científicos expertos en seguridad alimentaria y nutrición y se han aprobado más de 100 informes de evaluación de riesgos químicos, biológicos o nutricionales. Los informes se publican en la página web de la AESAN y como parte de la Revista del Comité Científico de la AESAN.

El balance de la actividad del Comité Científico en los últimos 15 años puede considerarse muy positivo gracias al compromiso y dedicación de los científicos que han pasado por él en este periodo.

#### Palabras clave

AESAN, Comité Científico, evaluación de riesgos.

## **Assessment of 15 years of the Scientific Committee as a food-related risk assessment body of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition**

### **Abstract**

The Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) is the risk assessment body that provides the Agency with scientific opinions on matters of food safety, defines the scope of the research works necessary for the Agency's functions and coordinates the work of expert groups that carry out risk assessments within the framework of the Agency's initiatives.

Since its formation 15 years ago, the Scientific Committee has welcomed 74 scientific experts in food safety and nutrition and has approved more than 100 chemical, biological and nutritional risk assessment reports. The reports are published on the AESAN website and in the Journal of the Scientific Committee of the AESAN.

The evaluation of the activity of the Scientific Committee over the last 15 years can be considered very positive thanks to the commitment and dedication of the scientists who have passed through it during this time.

### **Key words**

AESAN, Scientific Committee, risk assessment.

## 1. Introducción

La Ley 11/2001, de 5 de julio, de creación de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (BOE, 2001) establece como una de las funciones de la Agencia actuar como centro de referencia de ámbito nacional en la evaluación de riesgos alimentarios. Además, entre los principios específicos de actuación de la Agencia se especifica que prestará sus servicios de evaluación de riesgos y elaboración de dictámenes a las autoridades de las comunidades autónomas.

Por su parte, el Real Decreto 19/2014, de 17 de enero, por el que aprobó el Estatuto de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) (BOE, 2014) incluyó entre las funciones de la Agencia el facilitar a las Administraciones competentes soporte técnico y evaluaciones de riesgos en materia de seguridad alimentaria para su utilización en sus actuaciones normativas y ejecutivas, facilitando la coordinación de las entidades implicadas.

La evaluación de riesgos es la evaluación científica de los efectos perjudiciales, conocidos o potenciales, resultantes de la exposición humana a los peligros presentes en los alimentos (FAO/OMS, 1995), y es uno de las tres componentes, junto a la gestión y a la comunicación de riesgos, del análisis de riesgos en el que debe basarse la política de seguridad alimentaria en la Unión Europea.

Para abordar las funciones de evaluación de riesgos se creó un Comité Científico con la función de proporcionar a la Agencia dictámenes científicos en materia de seguridad alimentaria, definir el ámbito de los trabajos de investigación necesarios para las funciones de la Agencia y coordinar los trabajos de los grupos de expertos que realicen actividades de evaluación de riesgos en el marco de las actuaciones de la Agencia.

Los primeros miembros del Comité Científico fueron nombrados por el Consejo de Dirección de la Agencia el 18 de junio de 2003 y su primera reunión tuvo lugar el 2 de octubre de 2003.

Por tanto, en 2018 se han cumplido 15 años de la constitución del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y se puede hacer un balance de su funcionamiento en estos años como órgano de evaluación de riesgos alimentarios de la Agencia.

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAN) se creó en 2001 y en 2006 pasó a denominarse Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). En 2014, con la asunción de competencias en materia de consumo, pasó a llamarse Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) y, finalmente, en 2018, mediante el Real Decreto 1047/2018, de 24 de agosto, que desarrolla la estructura orgánica básica del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (BOE, 2018a), se transformó de nuevo a la AECOSAN en la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Ello supuso que la Agencia dejara de tener competencias en materia de consumo y que los órganos colegiados con funciones en esa materia, como es el caso de la Sección de Consumo del Comité Científico, se adscribieran Dirección General de Consumo.

A lo largo de este trabajo las referencias al Comité Científico desde 2014 a 2018 se deben entender como correspondientes únicamente a su Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición. En cuanto a la Agencia, cuando se mencione se utilizará generalmente la denominación de Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), salvo si se trata de referencias específicas que requieran utilizar otra denominación en vigor en ese momento.

## 2. Regulación del Comité Científico

Las funciones y procedimientos de actuación del Comité Científico de la AESAN han sido establecidos por distintas leyes, reales decretos y reglamentos.

### 2.1 Ley 11/2001 por la que se crea la AESA

La Ley 11/2001 de creación de la AESA (BOE, 2001) creó a su vez el Comité Científico con la función de proporcionar a la Agencia dictámenes científicos en materia de seguridad alimentaria, definir el ámbito de los trabajos de investigación necesarios para las funciones de la Agencia y coordinar los trabajos de los grupos de expertos que realicen actividades de evaluación de riesgos en el marco de las actuaciones de la Agencia.

### 2.2 Ley 44/2006 de mejora de la protección de los consumidores y usuarios

La Ley 44/2006 de mejora de la protección de los consumidores y usuarios (BOE, 2006a) cambió la denominación de Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA) a Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y le asignó una nueva función: planificar, coordinar y desarrollar estrategias y actuaciones que fomenten la información, educación y promoción de la salud en el ámbito de la nutrición y en especial la prevención de la obesidad. De forma correspondiente, el Comité Científico asumió esta nueva función en el ámbito de su cometido como órgano de evaluación de riesgos.

### 2.3 Ley 17/2011 de Seguridad alimentaria y nutrición

La Ley 17/2011 de Seguridad alimentaria y nutrición (BOE, 2011a) asignó al Comité Científico dos funciones a través de su artículo 31. Estas funciones se describen en los artículos 29 y 30 de la Ley 17/2011 y se refieren, por un lado, a la responsabilidad de impulsar, coordinar y aunar las actuaciones en materia de evaluación de riesgos alimentarios y, por otro, a la identificación y evaluación de riesgos alimentarios emergentes.

### 2.4 Real Decreto 19/2014 por el que se aprueba el Estatuto de la AECOSAN

El Real Decreto 19/2014 por el que se aprobó el Estatuto de la AECOSAN (BOE, 2014) supuso la integración del Instituto Nacional del Consumo y la AESAN, creándose la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). Esta nueva Agencia contaba con competencias en consumo y ello llevó a la creación de dos secciones diferenciadas dentro del Comité Científico, una Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición formada por 20 miembros y una Sección de Consumo formada por 10 miembros.

Otro cambio introducido por el nuevo Estatuto fue la desaparición del número de miembros del Comité Científico que debían corresponder a cada especialidad. Las especialidades se citaron a modo de ejemplo, sin obligar a contar con un número determinado de expertos en cada materia.

## 2.5 Reglamento interno del Comité Científico de la AESAN

El Reglamento interno de la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico de la AESAN (AESAN, 2014a) además de recoger lo establecido por la Ley 11/2001 y el Real Decreto 19/2014 para el Comité Científico, fija cuestiones como la periodicidad mínima de las reuniones, el régimen de sustituciones del Presidente y del Secretario Técnico o las funciones de la Secretaría Técnica ejercida por el Área de Evaluación de Riesgos de la Subdirección General de Promoción de la Seguridad Alimentaria.

## 3. Procedimiento de trabajo

El Estatuto de la Agencia fija algunos principios y procedimientos de trabajo del Comité Científico. Así, establece que el Comité Científico y sus grupos de expertos actuarán de acuerdo con los principios de excelencia e independencia en su actividad de evaluación. También se establece que el Comité Científico circunscribirá su ámbito de actuación a las solicitudes planteadas por el Consejo de Dirección, pudiendo elevar propuestas a dicho órgano por propia iniciativa, a través de la Dirección Ejecutiva. Por tanto, el Comité Científico debe actuar para cumplir los mandatos del Consejo de Dirección pero también puede hacer propuestas al Consejo.

El Estatuto establece que el Comité Científico se expresará formalmente mediante Informes del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, que se harán públicos de acuerdo con lo establecido en el artículo 39 del Estatuto y en los que se harán constar, en caso de controversia, los votos particulares motivados. Por ello, en los títulos de los informes se utiliza la palabra Informe y se trata de evitar la utilización de otros términos como Dictamen u Opinión.

El Comité Científico y sus miembros deben canalizar toda relación institucional derivada de su pertenencia a la Agencia a través de la Dirección Ejecutiva y del Consejo de Dirección. Además deben abstenerse de llevar a cabo actividades de comunicación de riesgos, así como cualquier tipo de manifestaciones o declaraciones en relación con su actividad de evaluación, sin la expresa autorización del Consejo de Dirección. Están obligados por el sigilo profesional durante el proceso de elaboración de informes y hasta tanto éstos se consideren finalizados y se hagan públicos.

Habitualmente el Comité Científico celebra cuatro reuniones presenciales al año pero también puede reunirse por medios electrónicos, de acuerdo con el artículo 17 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre, de Régimen Jurídico del Sector Público, todos los órganos colegiados se podrán constituir, convocar, celebrar sus sesiones, adoptar acuerdos y remitir actas a distancia.

Las reuniones presenciales suelen tener lugar en la sede de la AESAN en Madrid pero en algunas ocasiones se han celebrado fuera de Madrid, tal como sucedió con las sesiones celebradas en 2016 y 2018 en las Universidades de Valencia y de Murcia, respectivamente.

Una vez que una solicitud de informe es aprobada por el Consejo de Dirección, esta pasa al Comité Científico y se forma un grupo de trabajo, actuando uno de sus miembros como coordinador. Cuando el grupo de trabajo dispone de un borrador de informe, este se discute en una sesión plenaria con el resto del Comité y, en su caso, es aprobado.

En ocasiones es necesario incorporar al grupo de trabajo a expertos externos al Comité. Aproximadamente en una cuarta parte de los informes del Comité se ha contado con colaboradores externos. La AESAN dispone de una base de datos de expertos en seguridad alimentaria y nutrición a la que los expertos pueden incorporarse dejando constancia de cuáles son sus campos de experiencia (AESAN, 2018a). Para incorporarse a esta base de datos se debe contar con una experiencia relevante y contrastable, justificada a través de evidencias tales como publicaciones científicas, participación en proyectos de investigación o titulaciones de post-grado.

Una vez que un informe es aprobado por el plenario del Comité Científico, este es presentado al Consejo de Dirección y publicado en la página web de la AESAN.

### 3.1 Tasas y precios públicos

La AESAN presta algunos servicios de evaluación de riesgos a petición de solicitantes externos en el marco de sus competencias y previa aceptación por parte del Consejo de Dirección. Estos servicios de evaluación de expedientes y emisión de informes pueden estar sujetos a precios públicos o tasas.

De acuerdo con la Ley 8/1989, de 13 de abril, de Tasas y Precios Públicos (BOE, 1989), las tasas son los tributos cuyo hecho imponible consiste en la utilización privativa o el aprovechamiento especial del dominio público, la prestación de servicios o la realización de actividades en régimen de derecho público que se refieran, afecten o beneficien de modo particular al obligado tributario, cuando los servicios o actividades no sean de solicitud o recepción voluntaria para los obligados tributarios o no se presten o realicen por el sector privado. Por otra parte, tendrán la consideración de precios públicos las contraprestaciones pecuniarias que se satisfagan por la prestación de servicios o la realización de actividades efectuadas en régimen de Derecho público cuando, prestándose también tales servicios o actividades por el sector privado, sean de solicitud voluntaria por parte de los administrados.

Las tasas no están sujetas al impuesto sobre el valor añadido (IVA) mientras que este si es de aplicación a los precios públicos.

#### 3.1.1 Tasas

La Ley 17/2011, de 5 de julio, de Seguridad Alimentaria y Nutrición (BOE, 2011a), establece las tasas aplicables a la realización de evaluaciones de expedientes de alimentos, ingredientes alimentarios, coadyuvantes o procesos tecnológicos.

Las tasas son de aplicación a aquellas evaluaciones que la legislación establece que deben ser realizadas por el Comité Científico, como son:

- Real Decreto 1052/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria sobre determinados azúcares destinados a la alimentación humana (BOE, 2003).
- Real Decreto 1601/ 2010, de 26 de noviembre, por el que se aprueban las materias básicas para la elaboración de la goma base del chicle o goma de mascar (BOE, 2010).
- Real Decreto 847/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos (BOE, 2011b).

- Real Decreto 640/2015, de 10 de julio, por el que se aprueba la lista de coadyuvantes tecnológicos autorizados para la elaboración de aceites vegetales comestibles y sus criterios de identidad y pureza, y por el que se modifica la Reglamentación técnico-sanitaria de aceites vegetales comestibles (BOE, 2015)

Está previsto que, en un futuro próximo, se apruebe una normativa que autorice el uso de coadyuvantes tecnológicos en todas las etapas de la producción, la transformación y la distribución de distintos tipos de alimentos (AESAN, 2018b). Esta autorización requerirá una evaluación previa de la seguridad del uso de dichos coadyuvantes por parte del Comité Científico de la AESAN y, por tanto, estará sujeta a una tasa.

Actualmente, de acuerdo con el artículo Art. 55, apartado 3, de la Ley 17/2011, dentro del hecho imponible de realización de evaluaciones de expedientes de alimentos, ingredientes alimentarios, coadyuvantes o procesos tecnológicos se establecen tasas de distintas cuantías, entre 1 000 y 2 000 euros para estos conceptos:

- Evaluación de expedientes relativos a coadyuvantes tecnológicos (sustancias previamente autorizadas en alimentación humana).
- Evaluación de expedientes relativos a coadyuvantes tecnológicos (sustancias no autorizadas previamente en alimentación humana).
- Evaluación de expedientes relativos a procesos tecnológicos.
- Evaluación de expedientes relativos a alimentos e ingredientes alimentarios autorizados previamente en alimentación humana en la Unión Europea.
- Evaluación de expedientes relativos a alimentos e ingredientes alimentarios no autorizados previamente en alimentación humana en la Unión Europea.

El importe de estas tasas fijadas en 2011 se han ido actualizado con pequeños incrementos porcentuales fijados en las leyes presupuestarias de distintos ejercicios, de manera que entre 2011 y 2018 se han incrementado un 5,1 %.

### 3.1.2 Precios públicos

La Orden SAS/3397/2009, de 4 de diciembre, por la que se fijan los precios públicos por la realización de actividades de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (BOE, 2009) prevé la aplicación de precios públicos por la realización de distintas actividades de evaluación referidas a:

- Evaluación de expedientes relativos a coadyuvantes tecnológicos (sustancias previamente autorizadas en alimentación humana).
- Evaluación de expedientes relativos a coadyuvantes tecnológicos (sustancias no autorizadas previamente en alimentación humana).
- Evaluación de expedientes relativos a procesos tecnológicos.
- Evaluación de expedientes relativos a alimentos e ingredientes alimentarios autorizados previamente en alimentación humana en la Unión Europea. Evaluación de expedientes relativos a alimentos e ingredientes alimentarios no autorizados previamente en alimentación humana en la Unión Europea.

- Emisión de un informe de asesoramiento científico sobre la evaluación de riesgos alimentarios.

La evaluación de un mismo producto por parte del Comité Científico puede estar sujeta a una tasa o a un precio público. Así, por ejemplo, en este momento, la evaluación de la seguridad del uso de un coadyuvante tecnológico en la producción de determinados azúcares destinados a la alimentación humana estaría sujeta a una tasa ya que hay una norma que establece la obligación de obtener la opinión del Comité Científico antes de autorizar su utilización. Sin embargo, si el uso como coadyuvante se refiere a frutas u hortalizas la evaluación, estaría sujeta a un precio público ya que, actualmente, no hay normativa que obligue a que esta evaluación sea realizada por el Comité Científico.

#### 4. Miembros del Comité Científico

Los miembros del Comité Científico son seleccionados y nombrados por el Consejo de Dirección, a propuesta del Presidente, por un período de 2 años renovable. Los criterios de selección establecidos por el Estatuto se basan en la excelencia y adecuación de los candidatos a las funciones requeridas, así como en su independencia y su disponibilidad objetiva para el adecuado ejercicio de su función.

Los miembros del Comité Científico no perciben remuneración alguna derivada de su condición de miembros ni tampoco por el ejercicio de las funciones inherentes a su pertenencia al Comité.

La primera composición del Comité se mantuvo prácticamente sin cambios desde 2003 hasta 2008 y, a partir de ese momento, se produjeron renovaciones de su composición cada 2 años, de manera que diez miembros del Comité lo abandonan por haber cumplido 4 años de permanencia máxima y otros diez pueden continuar 2 años más hasta completar el periodo de 4 años.

En las convocatorias de renovación del Comité habitualmente se presentan entre 50 y 70 científicos procedentes de universidades, hospitales y otros centros de investigación. Únicamente es necesario presentar una solicitud, una declaración de intereses y un curriculum vitae completo.

La Ley 11/2001 establece los Principios específicos de actuación de la Agencia y, en ese sentido, indica que los miembros del Consejo de Dirección y del Comité Científico realizarán declaraciones de causas que generen situación de incompatibilidad para el desarrollo de su gestión.

Por su parte, el Estatuto de la AESAN establece que los miembros del Comité Científico deben cumplimentar ante la Secretaría del mismo una declaración de conflicto de intereses y deben actualizarla cuando se den circunstancias que así lo requieran, derivadas del ejercicio del cargo en relación con otras actividades profesionales. Cuando sean empleados públicos de la Administración General del Estado, dichas declaraciones se deben remitir a la Oficina de Conflictos de Intereses del Ministerio de Hacienda a efectos de que esta unidad resuelva acerca de la compatibilidad de estas actividades al amparo de la Ley 53/1984, de 26 de diciembre, de Incompatibilidades del personal al servicio de las Administraciones Públicas (BOE, 1984).

Además, antes del inicio de cada sesión, el Presidente del Comité recuerda a sus miembros la necesidad de no participar en la discusión de informes que puedan plantear un conflicto de interés.

El Estatuto también establece que en la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición se contará con especialistas pertenecientes a distintos campos, tales como Toxicología Alimentaria, Microbiología, Virología, Parasitología o Zoonosis Alimentarias, Epidemiología Humana, Epidemiología Animal, Biotecnología y Modificación Genética, Inmunología y Alergología, Nutrición Humana, Epidemiología y Salud Pública desde el punto de vista de la Nutrición, Alimentación Animal, Farmacología, Procesos Tecnológicos Alimentarios, o Análisis e Instrumentación.

El primer Estatuto de 2002 fijaba un número concreto de miembros para cada especialidad pero, en este momento, ya no es así, aunque se intenta cubrir la mayor variedad posible dentro de las especialidades necesarias en el Comité.

Los miembros de cada una de las secciones del Comité Científico nombran, de entre los mismos, un Presidente y un Vicepresidente. En el periodo 2003-2018 se ha contado con cinco Presidentes y cinco vicepresidentes (Tabla 1) y tres Secretarios Técnicos, entre ellos, el principal impulsor del Comité Científico, y Subdirector General de Coordinación Científica de la Agencia, Jesús Campos Amado.

| <b>Periodo</b> | <b>Presidente</b>                 | <b>Vicepresidente</b>    |
|----------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 2003-2010      | Andreu Palou Oliver               | Juan José Badiola Díez   |
| 2011-2012      | Rosaura Farré Rovira              | Francisco Martín Bermudo |
| 2013-2014      | Emilio Martínez de Victoria Muñoz | Antonio Martínez López   |
| 2015-2016      | Guillermina Font Pérez            | Ascensión Marcos Sánchez |
| 2017-2018      | Gaspar Ros Berruezo               | Ángeles Jos Gallego      |

Entre 2003 y 2018 han sido miembros del Comité Científico 74 científicos procedentes de universidades (81 %), centros de investigación (12 %) y hospitales (7 %). Entre 2003 y 2018 se han celebrado 62 sesiones, 60 de ellas presenciales y 2 realizadas por medios electrónicos. El porcentaje de asistencia a las sesiones por parte de los miembros del Comité en los últimos 5 años ha sido del 90 %.

La primera composición del Comité estaba formada por 17 hombres y 3 mujeres, y desde 2015 la composición ha resultado paritaria (Tabla 2). En cuanto a la distribución por profesiones, farmacéuticos y veterinarios han sido las más frecuentes entre los miembros del Comité (Tabla 3).

Madrid es la Comunidad Autónoma que más miembros ha aportado al Comité Científico, seguida de Cataluña y la Comunidad Valenciana (Tabla 4). Entre 2003 y 2018 las universidades de Barcelona, Complutense de Madrid, de las Islas Baleares y de Zaragoza han aportado expertos al Comité Científico de forma continuada.

**Tabla 2.** Distribución por género de los miembros del Comité Científico en el periodo 2003-2018

| Periodo                | Hombres   | Mujeres   |
|------------------------|-----------|-----------|
| 2003-2005              | 17        | 3         |
| 2006-2008              | 16        | 4         |
| 2009-2010              | 15        | 5         |
| 2011-2012              | 11        | 9         |
| 2013-2014              | 11        | 9         |
| 2015-2016              | 10        | 10        |
| 2017-2018              | 10        | 10        |
| <b>Total 2003-2018</b> | <b>46</b> | <b>28</b> |

**Tabla 3.** Distribución por profesión de los miembros del Comité Científico en el periodo 2003-2018

| Periodo                | Farmacéuticos | Veterinarios | Biólogos  | Médicos   | Químicos | Ingeniero Agrónomo | Ciencia y Tecnología Alimentos |
|------------------------|---------------|--------------|-----------|-----------|----------|--------------------|--------------------------------|
| 2003-2005              | 1             | 8            | 5         | 2         | 4        | 0                  | 0                              |
| 2006-2008              | 1             | 8            | 5         | 3         | 3        | 0                  | 0                              |
| 2009-2010              | 6             | 6            | 4         | 2         | 2        | 0                  | 0                              |
| 2011-2012              | 7             | 3            | 5         | 3         | 2        | 0                  | 0                              |
| 2013-2014              | 7             | 2            | 5         | 3         | 2        | 1                  | 0                              |
| 2015-2016              | 9             | 3            | 3         | 3         | 1        | 1                  | 0                              |
| 2017-2018              | 7             | 6            | 3         | 2         | 1        | 0                  | 1                              |
| <b>Total 2003-2018</b> | <b>23</b>     | <b>17</b>    | <b>15</b> | <b>10</b> | <b>7</b> | <b>1</b>           | <b>1</b>                       |

**Tabla 4.** Distribución por Comunidad Autónoma de los miembros del Comité Científico en el periodo 2003-2018

| Periodo              | 2003-2005 | 2006-2008 | 2009-2010 | 2011-2012 | 2013-2014 | 2015-2016 | 2017-2018 | Total 2003-2018 |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| Comunidad de Madrid  | 9         | 8         | 5         | 3         | 3         | 3         | 3         | <b>19</b>       |
| Cataluña             | 4         | 4         | 4         | 5         | 2         | 3         | 3         | <b>13</b>       |
| Comunidad Valenciana | 0         | 1         | 1         | 2         | 6         | 5         | 4         | <b>12</b>       |

**Tabla 4.** Distribución por Comunidad Autónoma de los miembros del Comité Científico en el periodo 2003-2018

| Periodo         | 2003-2005 | 2006-2008 | 2009-2010 | 2011-2012 | 2013-2014 | 2015-2016 | 2017-2018 | Total 2003-2018 |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| Andalucía       | 1         | 1         | 3         | 4         | 2         | 1         | 1         | 6               |
| Castilla y León | 3         | 3         | 2         | 1         | 1         | 1         | 2         | 6               |
| Aragón          | 2         | 2         | 2         | 2         | 2         | 1         | 1         | 5               |
| Galicia         | 0         | 0         | 2         | 2         | 1         | 1         | 0         | 3               |
| Islas Baleares  | 1         | 1         | 1         | 1         | 1         | 1         | 1         | 3               |
| Murcia          | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 2         | 2         | 2               |
| Islas Canarias  | 0         | 0         | 0         | 0         | 1         | 1         | 1         | 2               |
| Navarra         | 0         | 0         | 0         | 0         | 1         | 1         | 1         | 2               |
| La Rioja        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 1         | 1               |

## 5. Informes del Comité Científico

### 5.1 Solicitudes de informe

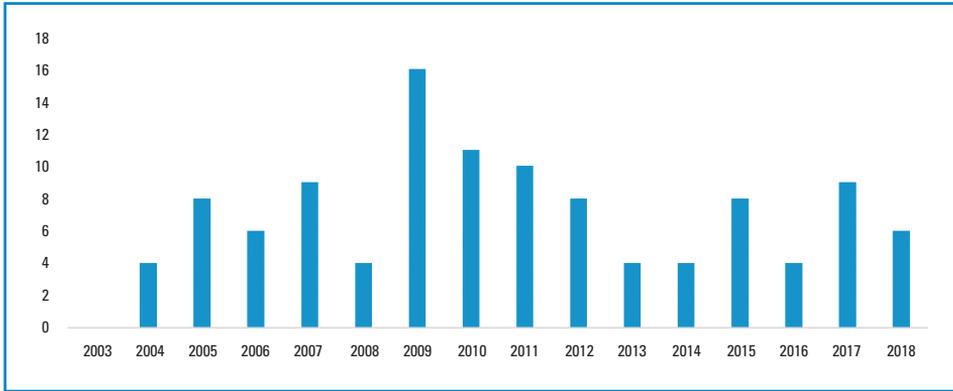
Las solicitudes de informe al Comité Científico pueden tener su origen en peticiones de entidades privadas o públicas. Las peticiones de entidades privadas se han producido en el marco del procedimiento de autorización de la comercialización de nuevos alimentos (AESAN, 2009a, 2013a, 2015a, 2017a, b, c) o de coadyuvantes tecnológicos (AESAN, 2008a, 2008b, 2011a, b, c), que desde 2011 han estado sujetos al pago de una tasa. Algunas peticiones de evaluación de coadyuvantes por parte de empresas se referían a productos utilizados en la desinfección bacteriana de frutas y hortalizas (AESAN, 2013b, 2016, 2017d, 2018c) que, al no existir regulación específica que obligara a hacer la evaluación en la AESAN, estaban sujetos al pago de un precio público.

En cuanto a las peticiones de entidades públicas, estas pueden ser peticiones de unidades de la Agencia o de entidades externas. Las unidades de Gestión de riesgos biológicos, químicos y nutricionales son los principales solicitantes dentro de la Agencia, seguidos de las unidades de Alertas alimentarias y de Control oficial y de la Vocalía de la Estrategia NAOS.

Dentro de las entidades públicas externas, las comunidades autónomas han realizado algunas solicitudes, tal como se recoge en algunos informes (AESAN, 2006, 2009b, c, 2015b). Se trata de un número bastante reducido de peticiones, aunque hay que tener en cuenta que algunos informes solicitados por la propia Agencia pueden estar inspirados en problemáticas planteadas por las comunidades autónomas en distintos foros.

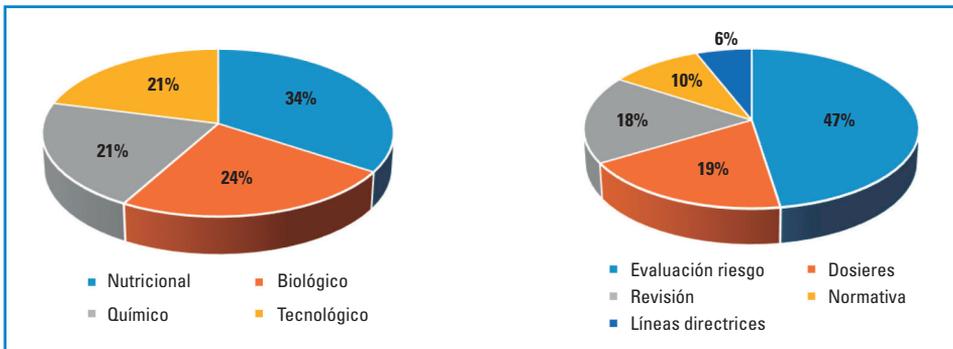
### 5.2 Informes emitidos

Desde 2003 a 2018 se han aprobado 111 informes, lo que supone una media de 7 informes anuales (Figura 1).



**Figura 1.** Informes del Comité Científico aprobados en el periodo 2003-2018

Las temáticas abordadas son muy variadas, en la figura 2 se puede observar la distribución de los informes por tipo de riesgo nutricional, biológico, químico o tecnológico, aunque en ocasiones el informe trata múltiples cuestiones y no es fácil clasificarlo en una categoría concreta.



**Figura 2.** Clasificación por tipo de riesgo y tipo de informe de los informes aprobados por el Comité Científico en el periodo 2003-2018

En el periodo 2003-2018 casi la mitad de los informes aprobados han correspondido a evaluaciones del riesgo de diversos tipos de peligros (47 %). Además, se han elaborado informes respecto a dosieres presentados por empresas para la evaluación de la seguridad del consumo o el uso de distintos alimentos o productos de uso alimentario (19 %), informes de revisión de una cuestión de interés en seguridad alimentaria (18 %), informes en relación a normativas en vigor (10 %) y líneas directrices (6 %).

El tiempo requerido para la aprobación de un informe depende de la cuestión concreta de que se trate. El tiempo medio ha sido de 240 días (8 meses) pero hay que tener en cuenta que en el caso de dosieres presentados por empresas (fundamentalmente nuevos alimentos o coadyuvantes tecnológicos) es frecuente requerir información adicional al solicitante y el tiempo que se tarda en aportar esa información no es achacable al Comité Científico. Sin tener en cuenta ese tipo de

informes, el tiempo medio requerido para la aprobación de un informe en el periodo 2003-2018 ha sido de 205 días (6,8 meses).

En cuanto al formato de los informes, los términos de referencia de la solicitud suelen presentarse en la introducción. Se cuenta con un resumen y palabras clave que son traducidos al inglés e incorporados al informe publicado en español y apartados de conclusiones y referencias. En general, los informes son bastante extensos, de una media de 20 páginas.

### 5.3 Revista del Comité Científico

La Ley 11/2001, al establecer los principios específicos de actuación de la Agencia indica que de acuerdo con el principio de transparencia todos los ciudadanos tienen el derecho de acceso, por el procedimiento que reglamentariamente se determine y entre otros, a los dictámenes científicos elaborados por la Agencia.

En este sentido, los informes del Comité Científico se hacen públicos a través de la página web de la AESAN, clasificados por fecha de aprobación y por tipo de riesgo, y como parte de la Revista del Comité Científico de la AESAN. Esta revista se comenzó a publicar en 2005 y tiene una periodicidad bianual. Hasta 2011 se publicaba también en papel pero desde entonces sólo se ha publicado en su versión electrónica.

La publicación de los informes como parte de una revista facilita su citación referenciada por parte de otros científicos en sus publicaciones. Además, para favorecer la difusión internacional de los informes del Comité Científico, desde 2006 en los informes se incluye el resumen y las palabras clave en inglés y, desde 2011, se traducen íntegramente al inglés.

Aunque los informes son accesibles a través de la página web de la AESAN, también se incluyen en la plataforma de intercambio de información sobre evaluación de riesgos *knowledge junction* de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

La publicación electrónica en Internet de la Revista deben cumplir el nivel de requisitos AA de la Norma UNE 139803:2012 (UNE, 2012). Esta norma establece las características que han de cumplir la información y otros contenidos disponibles mediante tecnologías web en Internet, intranets y cualquier tipo de redes informáticas, para que puedan ser utilizados por la mayor parte de las personas, incluyendo personas con discapacidad y personas de edad avanzada, bien de forma autónoma o mediante los productos de apoyo pertinentes.

### 5.4 Utilización de los informes en la gestión de riesgos alimentarios

La principal utilidad de las evaluaciones de riesgos realizadas por el Comité Científico es permitir tomar decisiones de gestión de riesgos basadas en la mejor evidencia científica.

Las primeras menciones a informes del Comité Científico que aparecen en la legislación son las que figuran en el Real Decreto 1420/2006 sobre prevención de la parasitosis por anisakis en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades (BOE, 2006b) y en el Real Decreto 463/2011 por el que se establecen para los lagomorfos medidas singulares de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene de la producción y comercialización de los productos alimenticios (BOE, 2011c).

A continuación se comentan algunos informes que han resultado de especial trascendencia para la gestión de riesgos ya que han permitido modificar legislación nacional e internacional o basar campañas de comunicación para prevenir riesgos alimentarios.

#### 5.4.1 Riesgo de triquinosis por consumo de carne de lechón

El informe aprobado en 2012 en relación con el riesgo de triquinosis por consumo de carne de lechón (AESAN, 2012a) ha tenido una repercusión especialmente relevante por su alcance internacional.

El Reglamento (CE) N° 2075/2005, por el que se establecían normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne (UE, 2005), indicaba que las canales de cerdos domésticos debían ser sometidas a muestreos sistemáticos en los mataderos en el marco de los exámenes *postmortem*, sin que los lechones de corta edad sacrificados para el consumo humano tuvieran un tratamiento diferenciado.

Ello obligaba a que los lechones fueran también muestreados para realizar el control de triquina cuando, en principio y en determinados casos de cría controlada, podía no ser necesario.

En su informe, el Comité Científico opinó que para cualquier tipo de explotación, los datos científicos disponibles consideran que hasta el destete, realizado entre los 21 y 28 días de vida, y durante las semanas posteriores al mismo, la fisiología del sistema digestivo de los lechones está adaptada a la digestión de proteínas lácteas y no está preparada para la digestión de carne. Por otro lado, el control pormenorizado que debe hacerse de la alimentación, para no comprometer el desarrollo y vida de los cerdos, hace que el riesgo de que los lechones ingieran carne u otros productos infectados con *Trichinella* spp. o que esta pueda completar su ciclo biológico hasta larva infectante antes del sacrificio de los animales pueda considerarse bajo.

Manteniendo los plazos habituales de destete a los 21-28 días y considerando los escenarios de mayor riesgo (cerdos recién destetados y en ambiente extensivo que tuvieran acceso a material contaminado con *Trichinella*), la posibilidad de aparición de larvas infectantes estaría comprendida entre los 38 y 47 días de vida (más de 5 semanas), por lo que la edad máxima de sacrificio que permitiría considerar que el riesgo de transmisión de triquinosis en cerdos no controlados destetados a los 21 días de vida es bajo, podría establecerse en 5 semanas (35 días).

Conforme a las conclusiones de este informe, el Reglamento (UE) 2015/1375 que derogó el Reglamento (CE) N° 2075/2005, y por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne (UE, 2015) recogió que no será necesario investigar la presencia de triquinas en las canales y la carne de cerdos domésticos no destetados de menos de 5 semanas de edad.

Por su parte, a nivel internacional, el *Codex Alimentarius*, el sus directrices para el control de *Trichinella* spp., en la carne de suidos (Codex, 2015) ha utilizado el informe del Comité Científico como referencia para establecer que los cerdos no destetados y sacrificados a una edad inferior a las 5 semanas pueden quedar exentos de las medidas de control posteriores al sacrificio cuando exista información relevante que pueda ser verificada por la autoridad competente.

#### **5.4.2 Condiciones de uso de determinadas sustancias para ser empleadas en complementos alimenticios**

Otra serie de informes aprobados entre 2012 y 2017 sobre condiciones de uso de determinadas sustancias para ser empleadas en complementos alimenticios han permitido la publicación en 2018 del Real Decreto 130/2018 por el que se modifica el Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios (BOE, 2018b).

Los complementos alimenticios son productos alimenticios cuyo fin es complementar la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada.

El Real Decreto 1487/2009 regula las vitaminas y minerales que pueden utilizarse en la fabricación de complementos alimenticios en España pero no el uso de otras sustancias como complementos alimenticios. Ello causaba que las empresas que deseaban comercializar estas otras sustancias distintas de vitaminas y minerales notificaran primero su comercialización en otro país de la Unión Europea y luego en España basándose en el principio de reconocimiento mutuo dentro de la Unión Europea.

Con el fin de resolver este problema se solicitó al Comité Científico que evaluara la seguridad del uso como complementos alimenticio de una serie de sustancias distintas de vitaminas y minerales. El Comité evaluó 78 de estas sustancias, sus cantidades máximas diarias y advertencias para el consumidor en cinco informes (AESAN, 2012b, 2013c, 2014b, 2015c, 2017e).

Como consecuencia de estos informes, el Real Decreto 130/2018 (BOE, 2018b) modificó el Real Decreto 1487/2009 autorizando la utilización de determinadas sustancias con efecto nutricional o fisiológico distintas de vitaminas y minerales en la fabricación de complementos alimenticios.

#### **5.4.3 Criterios de seguridad que limiten la exposición a acrilamida producida por la fritura de patatas**

Las medidas de gestión del riesgo no sólo implican aspectos legislativos sino que también pueden referirse a la comunicación a los consumidores con el fin de evitar o reducir su exposición a determinados riesgos alimentarios.

El Comité Científico de AESAN emitió en 2017 un informe sobre los criterios de seguridad que limiten la exposición a acrilamida producida por la fritura de patatas, con recomendaciones para su aplicación en el ámbito doméstico (AESAN, 2017f) y que se han recogido en un folleto desplegable (Figura 3).

|  |   |
|--|---|
| <p><b>1. Compra las patatas...</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• En su punto óptimo de maduración, sin brotes ni partes verdes.</li> <li>• Procura que no sean muy pequeñas ya que éstas acumulan más azúcares reductores.</li> </ul>   | <p><b>2. Ya en casa...</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Consérvalas fuera de la nevera.</li> <li>• Guárdalas en lugar seco y oscuro que evite la germinación.</li> <li>• Evita su almacenamiento prolongado.</li> </ul>   |
| <p><b>3. Antes de freír...</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Valora un corte de la patata grueso y en tiras ("estilo francés") mejor que fino y en rodajas.</li> <li>• Lava las patatas con abundante agua del grifo.</li> <li>• Sécalas completamente antes del cocinado, así evitarás también largas frituras.</li> </ul> | <p><b>4. Durante el cocinado...</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Elige siempre que puedas cocción, horneado o uso del microondas frente a la fritura.</li> <li>• Evita freír a temperaturas mayores de 175 °C.</li> <li>• Reduce el tiempo de fritura.</li> <li>• Retíralas cuando tengan color dorado y, en todo caso, rechaza las demasiado oscuras.</li> <li>• Limita la reutilización del aceite de fritura y ventila la cocina al terminar.</li> </ul> |

**Figura 3.** Folleto desplegable sobre acrilamida en los alimentos. Un caso particular: las patatas fritas. Recomendaciones del Comité Científico de la AESAN. **Fuente:** (AESAN, 2018d).

## 6. Discusión

En noviembre de 2018 se realizó una encuesta anónima a todos los miembros del Comité Científico sobre distintos aspectos del proceso de incorporación al Comité, las reuniones, los informes y su opinión global. A la encuesta respondieron 17 de los 18 miembros del Comité que asistieron a la sesión de 28 de noviembre de 2018 en la que se recogieron las encuestas.

Con las preguntas que daban opción a dar cinco respuestas de menos a más positiva (por ejemplo, de muy inadecuado a muy adecuado) se puede obtener una valoración numérica al multiplicar de forma correspondiente cada respuesta por un número de 1 (respuesta más negativa) a 5 (respuesta más positiva) y hacer la media. Una puntuación de 3 indicaría un punto intermedio, ni positivo ni negativo, por encima de 3 la respuesta sería positiva y por debajo de 3, negativa.

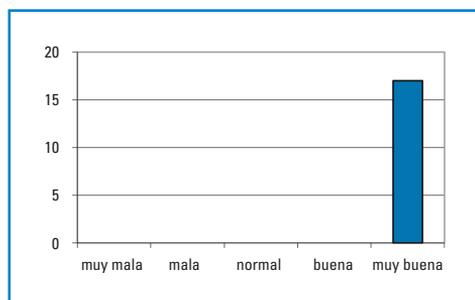
En ninguna de las preguntas realizadas se ha obtenido una respuesta media negativa.

- **Entre 4,5 y 5:** Los aspectos mejor valorados por los miembros del Comité fueron la propia experiencia de la pertenencia al Comité (5), que todos señalan como muy buena (Figura 4), la atención personal (4,94) y el apoyo técnico (4,88) (Figura 5) y el apoyo administrativo (4,88) ofrecido por la AESAN, destacando aquí también la organización de los viajes (4,88) que casi un 90 % considera muy adecuada. Otros aspectos muy bien valorados se refieren a la organización de las reuniones (4,59-4,53) y a la información proporcionada por la AESAN para la elaboración de los informes (4,53).
- **Entre 4 y 4,5:** Las especialidades representadas en el Comité (4,47) (Figura 6), la calidad de los informes (4,47) y su formato (4,29) también son muy bien valorados, así como los medios disponibles para las reuniones en la AESAN (4,24) y los términos de referencia facilitados por la Agencia (4).
- **Entre 3,5 y 4:** La sencillez del proceso para formar parte del Comité (4) (Figura 7), el contenido de la información sobre el Comité (3,88), la visibilidad de los informes (3,76) y del Comité (3,53)

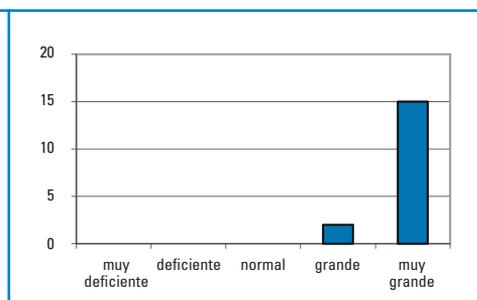
en la página web de la AESAN fueron bien valorados en general, pero no tanto como los aspectos indicados anteriormente.

Algunas preguntas referidas a cuestiones temporales no permiten hacer una valoración numérica como las anteriores. Aunque la mayoría de las respuestas consideraban de una duración normal el periodo máximo de pertenencia al Comité, casi un tercio lo consideró corto o muy corto (Figura 8) y propusieron alternativas como 3+2 o 3+3 años. En general, la duración de las sesiones se consideró suficiente y también el número de sesiones presenciales anuales (cuatro). Finalmente, el tiempo requerido para elaborar los informes fue considerado de una duración intermedia por la mayoría de los miembros del Comité y largo por dos de ellos.

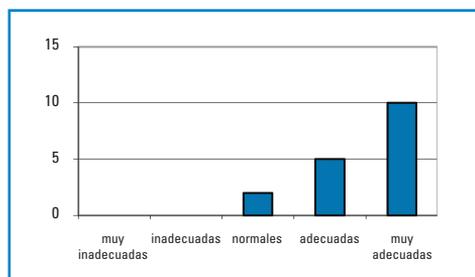
En la mayoría de los casos no hay una gran divergencia en las respuestas obtenidas a cada pregunta. La mayor variabilidad se produce en las respuestas sobre la visibilidad de los informes o del propio Comité, en las que, aunque se concentran en la respuesta que la considera adecuada, se han dado las cinco respuestas posibles (Figura 9).



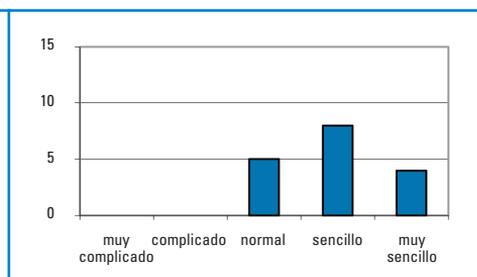
**Figura 4.** Experiencia de la pertenencia al Comité Científico



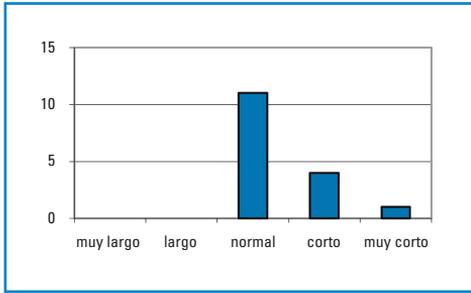
**Figura 5.** Apoyo técnico recibido por parte de la Secretaría Técnica del Comité Científico



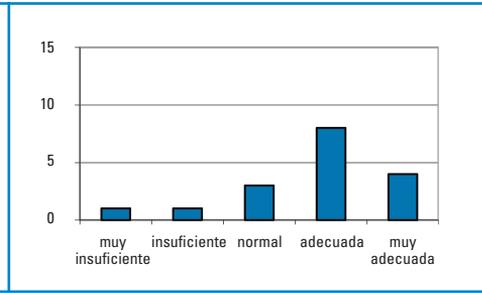
**Figura 6.** Especialidades representadas en el Comité Científico



**Figura 7.** Proceso para formar parte del Comité Científico



**Figura 8.** Tiempo máximo de pertenencia al Comité Científico



**Figura 9.** Visibilidad de los informes del Comité Científico en la página web de la AESAN

De acuerdo con las respuestas recibidas, la opinión global sobre el funcionamiento de la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico es muy positiva.

El periodo de permanencia en el Comité puede parecer algo breve pero también hay que tener en cuenta que se trata de una actividad no remunerada y que es conveniente dar oportunidad a otros científicos a conocer y colaborar con la Agencia. A diferencia de los modelos de algunos países que trabajan con paneles diferenciados por áreas de conocimiento, el Comité Científico de la AESAN tiene un carácter multidisciplinar y científicos de distintos ámbitos conviven dentro de una misma estructura. Ello es especialmente útil cuando se tratan cuestiones que deben abordarse desde distintos campos de conocimiento pero, además, ayuda a contar con una diversidad de puntos de vista.

El coste de este órgano colegiado se limita a la organización de reuniones y al mantenimiento de una pequeña dotación de personal de evaluación de riesgos de la Agencia para gestionarlo y facilitar la elaboración de informes proporcionando apoyo científico-técnico y administrativo.

La posibilidad que ofrece el Estatuto respecto a la constitución de grupos de expertos de evaluación de riesgos alimentarios y de nutrición bajo la dependencia del Comité Científico amplía las posibilidades de colaboración de otros científicos con la Agencia

Aunque los plazos de elaboración de los informes son razonables se puede avanzar y mejorar mediante la utilización de plataformas colaborativas en línea y reuniones de los grupos de trabajo antes de las sesiones plenarias.

La difusión de los informes del Comité, tanto hacia los consumidores como hacia los profesionales, puede mejorarse mediante un aumento de su visibilidad en la página web de la Agencia, en medios de comunicación y en redes y mediante su indexación en buscadores científicos, lo cual puede requerir su publicación en revistas científicas con revisión por pares.

El balance de la actividad del Comité Científico en los últimos 15 años puede considerarse muy positivo y ello se debe al compromiso y dedicación de los científicos que han pasado por él en este periodo.

## Referencias

- AESAN (2006). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Dictamen en relación con el empleo del cloruro de litio como marcador en vinos con destino a la destilación. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 4, pp: 55-59.
- AESAN (2008a). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Evaluación del uso de la sal sódica del ácido poliaspártico como coadyuvante tecnológico en la producción del azúcar. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 8, pp: 69-70.
- AESAN (2008b). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Evaluación del uso del extracto de lúpulo en solución acuosa como coadyuvante tecnológico en la producción del azúcar. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 8, pp: 71-72.
- AESAN (2009a). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a una solicitud de evaluación inicial para la comercialización de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) precocida y congelada, en el marco del Reglamento (CE) N° 258/97 de Nuevos Alimentos y Nuevos Ingredientes. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 10, pp: 9-18.
- AESAN (2009b). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre los criterios de seguridad aplicables al contenido de ácido domoico en la vieira (*Pecten maximus*) para su recolección. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 10, pp: 41-52.
- AESAN (2009c). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el consumo humano ocasional de almortas (*Lathyrus sativus*). *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 11, pp: 9-19.
- AESAN (2011a). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al uso de una arcilla caolinítica como coadyuvante tecnológico en el proceso de obtención del aceite de oliva virgen. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 15, pp: 103-114.
- AESAN (2011b). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al uso del peróxido de hidrógeno como coadyuvante tecnológico en el procesado de hemoderivados y cefalópodos. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 15, pp: 11-32.
- AESAN (2011c). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al uso del carbonato cálcico como coadyuvante tecnológico en el proceso de obtención de aceite de oliva virgen. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 15, pp: 33-41.
- AESAN (2012a). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con el riesgo de triquinosis por consumo de carne de lechón. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 15, pp: 115-130.
- AESAN (2012b). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios-1. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 17, pp: 11-234.
- AESAN (2013a). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe en relación a una solicitud de evaluación inicial para la comercialización de la microalga marina *Tetraselmis chuii* en el marco del Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 18, pp: 11-27.

- AESAN (2013b). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe en relación al uso de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peracético como coadyuvante tecnológico para la desinfección bacteriana de cítricos y pimientos y el agua de lavado de los mismos. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 18, pp: 53-69.
- AESAN (2013c). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios-2. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 18, pp: 71-92.
- AESAN (2014a). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Reglamento interno del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.
- AESAN (2014b). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias para ser empleadas en complementos alimenticios-3. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 19, pp: 51-93.
- AESAN (2015a). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe en relación a una solicitud de evaluación inicial para la comercialización de hidroxitirosol obtenido por síntesis química en el marco del Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 21, pp: 11-25.
- AESAN (2015b). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe sobre el empleo como sal comestible del cloruro sódico obtenido a partir de un proceso de producción de cloruro potásico por flotación. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 21, pp: 27-35.
- AESAN (2015c). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias para ser empleadas en complementos alimenticios-4. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 22, pp: 79-131.
- AESAN (2016). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe en relación al uso de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peracético (23/17/15) como coadyuvante tecnológico para la desinfección bacteriana de cítricos y tomates y el agua de lavado de los mismos. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 23, pp: 21-43.
- AESAN (2017a). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe en relación a una solicitud de evaluación inicial para la comercialización de un liofilizado de la microalga marina *Tetraselmis chuii* en complementos alimenticios en el marco del Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 25, pp: 11-21.
- AESAN (2017b). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe en relación a una solicitud de evaluación inicial para la comercialización de semillas de chía (*Salvia hispanica*) en platos preparados esterilizados basados en granos de cereales, pseudocereales y/o legumbres, en el marco del Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 25, pp: 47-54.
- AESAN (2017c). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe en relación a una solicitud de evaluación inicial para la comercialización de semillas de chía (*Salvia hispanica*) en chocolate en tabletas, en el marco del Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 26, pp: 21-27.
- AESAN (2017d). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe sobre el uso de una solución acuosa de ácido fosfórico y propilenglicol como coadyuvante tecnológico para la estabilización del cloro utilizado en el lavado de vegetales frescos cortados y hortalizas de hoja de IV gama. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 26, pp: 11-19.

- AESAN (2017e). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre advertencias en el etiquetado de determinadas sustancias para ser empleadas en complementos alimenticios-5. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 25, pp 41-45.
- AESAN (2017f). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los criterios de seguridad que limiten la exposición a acrilamida producida por la fritura de patatas. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 26, pp: 29-55.
- AESAN (2018a). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Base de datos de Expertos en Seguridad Alimentaria y Nutrición. Disponible en: <https://expertal-aecosan.msssi.gob.es/Expertal/loginWeb.exp?execution=e1s1> [acceso: 3-12-18].
- AESAN (2018b). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Borrador proyecto relativo a los coadyuvantes tecnológicos autorizados en alimentos. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/PROYECTO\\_coayuvantes\\_tecnologicos\\_consulta.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/PROYECTO_coayuvantes_tecnologicos_consulta.pdf) [acceso: 3-12-18].
- AESAN (2018c). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe en relación a la seguridad del uso de varias soluciones acuosas de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peracético como coadyuvantes tecnológicos para la desinfección bacteriana del agua de lavado de cítricos y pimientos en las plantas de procesado. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 27, pp: 41-59.
- AESAN (2018d). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Acrilamida en los alimentos. Nuevas normas y recomendaciones por tu salud. Madrid - 8 de noviembre de 2018. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/seguridad\\_alimentaria/ACRILAMIDA\\_ALIMENTOS.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/seguridad_alimentaria/ACRILAMIDA_ALIMENTOS.pdf) [acceso: 3-12-18].
- BOE (1984). Ley 53/1984, de 26 de diciembre, de Incompatibilidades del Personal al Servicio de las Administraciones Públicas. BOE N° 4 de 4 de enero de 1985, pp: 165-168.
- BOE (1989). Ley 8/1989, de 13 de abril, de Tasas y Precios Públicos. BOE N° 90 de 15 de abril de 1989, pp: 10894-10898.
- BOE (2001). Ley 11/2001, de 5 de julio, por la que se crea la Agencia Española de Seguridad Alimentaria. BOE N° 161 de 6 de julio de 2001, pp: 24250-24255.
- BOE (2002). Real Decreto 709/2002, de 19 de julio, por el que se aprueba el Estatuto de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria. BOE N° 178 de 26 de julio de 2002, pp: 27560-27570.
- BOE (2003). Real Decreto 1052/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria sobre determinados azúcares destinados a la alimentación humana. BOE N° 184 de 2 de agosto de 2003, pp: 29975-29977.
- BOE (2006a). Ley 44/2006, de 29 de diciembre, de mejora de la protección de los consumidores y usuarios. BOE N° 312 de 30 de diciembre de 2006, pp: 46601-46611.
- BOE (2006b). Real Decreto 1420/2006, de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por anisakis en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades. BOE N° 302 de 19 de diciembre de 2006, pp: 44547-44549.
- BOE (2009). Orden SAS/3397/2009, de 4 de diciembre, por la que se fijan los precios públicos por la realización de actividades de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. BOE N° 303 de 17 de diciembre de 2009, pp: 106606-106609.
- BOE (2010). Real Decreto 1601/2010, de 26 de noviembre, por el que se aprueban las materias básicas para la elaboración de la goma base del chicle o goma de mascar. BOE N° 305 de 16 de diciembre de 2010, pp: 103888-103893.
- BOE (2011a). Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición. BOE N° 160 de 6 de julio de 2011, pp: 71283-71319.

- BOE (2011b). Real Decreto 847/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos. BOE N° 164 de 11 de julio de 2011, pp: 76316-76330.
- BOE (2011c). Real Decreto 463/2011, de 1 de abril, por el que se establecen para los lagomorfos medidas singulares de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene de la producción y comercialización de los productos alimenticios. BOE N° 89 de 14 de abril de 2011, pp: 38696-38697.
- BOE (2014). Real Decreto 19/2014, de 17 de enero, por el que se refunden los organismos autónomos Instituto Nacional del Consumo y Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición en un nuevo organismo autónomo denominado Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición y se aprueba su estatuto. BOE N° 29 de 3 de febrero de 2014, pp: 7264-7290.
- BOE (2015). Real Decreto 640/2015, de 10 de julio, por el que se aprueba la lista de coadyuvantes tecnológicos autorizados para la elaboración de aceites vegetales comestibles y sus criterios de identidad y pureza, y por el que se modifica el Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles. BOE N° 179 de 28 de junio de 2015, pp: 64243-64249.
- BOE (2018a). Real Decreto 1047/2018, de 24 de agosto, por el que se desarrolla la estructura orgánica básica del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social y se modifica el Real Decreto 595/2018, de 22 de junio, por el que se establece la estructura orgánica básica de los departamentos ministeriales. BOE N° 206 de 25 de agosto de 2018, pp: 84681-84704.
- BOE (2018b). Real Decreto 130/2018, de 16 de marzo, Real Decreto 130/2018, de 16 de marzo, por el que se modifica el Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios. BOE N° 206 de 27 de marzo de 2018, pp: 33335-33342.
- Codex (2015). *Codex Alimentarius*. Directrices para el control de *Trichinella* spp., en la carne de suidos. CAC/GL 86-2015.
- FAO/OMS (1995). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud. Informe de la Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la aplicación del análisis de riesgos a cuestiones de normas alimentarias, Ginebra, 13-17 de marzo de 1995 (WHO/FNU/FOS/95.3).
- UE (2005). Reglamento (CE) N° 2075/2005 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2005, por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne. DO L 238 de 22 de diciembre de 2005, pp: 60-82.
- UE (2015). Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1375 de la Comisión, de 10 de agosto de 2015, por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne. DO L 212 de 11 de agosto de 2015, pp: 7-34.
- UNE (2012). Norma española UNE 139803:2012. Requisitos de accesibilidad para contenidos en la web.

---

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:

Jos, A., Daschner, A., Rodríguez, D., Ros, G., Ruiz, M.J. y Tur, J.A. Grupo de trabajo (2017). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a una solicitud de evaluación inicial para la comercialización de semillas de chía (*Salvia hispanica*) en platos preparados esterilizados basados en granos de cereales, pseudocereales y/o legumbres, en el marco del Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 25, pp: 47-54.

Abreviatura revista: Rev. Com. Cient. AESAN

