

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 Tàlens 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 «Figtelli».

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 Szwedra, 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 (Bancercz-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 2×10^5 y 3×10^7 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 β -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 rumiantes (cabra y oveja), bovinos, porcinos y animales de compañía (gatos y perros) utilizando muestras de abortos de animales (rumiantes) 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 μm 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 1×10^5 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 mucoide, 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., Myrmet, 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 [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., Bouwknecht, 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., Hoidal, 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 n° 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. [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. Cloeckert, 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 β -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/ [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.