Prólogo

Yo pienso que en la alimentación es donde el ser humano puso más imaginación, mucha más que en la guerra, tanta como pudo poner en el amor, y sin duda muchísima más de la que pone en la política.

Álvaro Cunqueiro, escritor y gastrónomo

No es la primera vez que la **Sección 5ª: Salud Pública, Alimentación y Medio Ambiente** publica un texto sobre Seguridad Alimentaria. Del 4 al 7 de noviembre de 2002, bajo los auspicios de la Real Academia Nacional de Farmacia —que cuenta entre sus miembros con docentes y profesionales de la salud pública de reconocido prestigio— tuvo lugar en su sede un ciclo de conferencias para licenciados y doctores que, a solicitud de los que asistieron al mismo, fueron revisadas por quienes las dictaron y después de ampliadas convenientemente, se incluyeron, bajo el título **Temas escogidos de Seguridad Alimentaria**, en la monografía XIII de la "serie monografías" que edita nuestra Institución. Habiendo transcurridos ocho años desde su publicación y estando agotada prácticamente la edición, se creyó conveniente insistir en un tema que sigue estando de palpitante actualidad. De aquí que en una de las reuniones de la Sección 5ª se acordase solicitar de la Junta de Gobierno de la RANF ayuda para editar una nueva monografía con el título de **Aspectos Higiénicos de los Alimentos Microbiológicamente Seguros**.

De modo casual es interesante destacar que la preparación de esta monografía coincide con la publicación de un excelente trabajo sobre el catálogo de genes de los microorganismos de nuestro intestino, al que denominan nuestro otro genoma (*A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature, 2010, vol 464, pp.: 59-65*). El trabajo realizado por múltiples autores y el consorcio MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract), permite comprender el impacto de la microbiota de nuestro intestino en

nuestra salud. Los 124 individuos sobre los que se realizó el estudio fueron seleccionados en Dinamarca y España, buscando diferentes características de alimentación, obesidad, y varias patologías. Se ha estimado que el numero de bacterias de nuestro intestino es 10 veces mayor que el de las células de nuestro organismo, con unos 1.000 tipos de bacterias diferentes, de las cuales 160 son ampliamente compartidas entre todos los humanos, sobre todo al alcanzar la edad adulta.

Estos datos deberían de hacernos reflexionar, en primer lugar en la dificultad de conseguir una seguridad microbiológica absoluta de los alimentos, pero también en la gran cantidad de bacterias que han sido y son compañeras de viaje desde los primeros homínidos. No nos hemos parado a pensar cuantas de ellas podrían ser de utilidad para evitar enfermedades colonizando nuestro intestino o para procesar alimentos, transformándolos en algo mas digerible, entre otros muchos usos.

A la espera de beneficiarnos de nuestros propios microorganismos tenemos por el momento que hacer frente a todos los microbios patógenos que pueden contaminar o indicar un proceso con fallos en el diseño o distribución de los alimentos. Es un hecho constatado en las últimas décadas y en todos los países industrializados, que en su población ha crecido la preocupación por la seguridad de los alimentos en general. Los consumidores exigen que se les garantice que los productos alimenticios que adquieren en mercados, autoservicios, supermercados y otros comercios, lo mismo que las comidas que ingieren en restaurantes, cafeterías y otros establecimientos de *catering*, sean seguros, nutritivos y salubres. Por ello las asociaciones de consumidores demandan de la Administración del Estado sistemas de vigilancia alimentaria eficaces que se preocupen cuanto sea posible de la seguridad de los alimentos.

¿Qué son alimentos seguros? Las respuestas a esta pregunta varían mucho dependiendo del nivel cultural de quién conteste. Mientras la mayoría de la población cree que un alimento seguro es el que carece de peligros, esto es, el que presenta un riesgo 0, los fabricantes de alimentos piensan que lo es el que tiene un riesgo tan mínimo, que a efectos prácticos se considera aceptable. Higienistas y bromatólogos admiten que el riesgo 0 es inalcanzable por la enorme variedad de alimentos disponibles, por la diversidad de los sistemas de conservación utilizados, por la complejidad de la cadena de distribución y venta y por la propia naturaleza humana. La Comisión del *Codex Alimentarius* señaló en 1995 que la producción de alimentos seguros requiere un control efectivo de las materias primas, un buen diseño de la planta elaboradora y del equipo de procesado, buenas prácticas higiénicas durante la cadena de producción, pro-

cesado, distribución y uso y por último, pero no menos importante, una supervisión estricta, con fines preventivos (¡no punitivos!) de todas las dependencias de la fábrica. Por tanto, la producción de alimentos seguros necesita la colaboración de cuantos trabajan en la fábrica, desde los operarios de limpieza y técnicos de todo tipo, hasta el personal de gerencia y el director general.

Muchas de estas preguntas son planteadas y analizadas en esta excelente monografía, coordinada por Don Bernabé Sanz Pérez, quien ha conseguido la colaboración de excelentes científicos para dar una visión amplia y actual de este tema que tiene sus inicios en la más remota antigüedad, pero en pleno desarrollo por las nuevas técnicas de conservación y procesado de alimentos. Antes el ser humano para sobrevivir necesitaba guardar y conservar alimentos para épocas de escasez, después por necesidad, comodidad y facilitar la vida en las ciudades y ahora por necesidad, comodidad, sibaritismo y la atracción por los alimentos exóticos y caprichosos, además de la falta de tiempo.

La financiación de la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación Casares Gil, han permitido que esta excelente monografía que consta de 10 capítulos sea editada. Los autores de los distintos capítulos de esta monografía responden con claridad y conocimiento a las reflexiones que acabamos de hacer. Todos ellos son catedráticos, académicos o especialistas de reconocido prestigio en su campo, que pudiendo escribir un auténtico tratado del tema que se les asignó, han hecho el esfuerzo de condensarlo, de forma didáctica y en pocas páginas, para disfrute de sus lectores. Estoy segura que será un libro de frecuente consulta tanto entre los jóvenes que quieran profundizar en lo tratado en sus distintos capítulos, como en los no tan jóvenes que deseen caminar por el frondoso bosque de la seguridad alimentaria. La RANF se honra al presentar a la comunidad científica, a las autoridades sanitarias, a los técnicos de la industria alimentaria, a la opinión pública y a los medios de comunicación la serie de temas que aquí se tratan con el mayor rigor científico. Deseo a los lectores que sepan apreciar el contenido del libro y que disfruten de su lectura, será la mejor recompensa al esfuerzo de sus autores.

María Teresa Miras Portugal
Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia

Presentación

Aunque los conocimientos básicos sobre la naturaleza y metabolismo de los alimentos se inician en el último tercio del siglo XIX, las primeras décadas del XX fueron testigos de un fructífero periodo de intensa investigación sobre los nutrientes de los alimentos, imprescindibles para el crecimiento y desarrollo normal de la especie humana y de los animales de renta. Fue entonces cuando se descubrieron la mayoría de las vitaminas, minerales, aminoácidos y ácidos grasos esenciales o indispensables para una buena nutrición.

La revolución biológica que supuso el establecimiento y descripción de mapas de los genomas de la especie humana y otras especies, facilitada por los avances en Bioquímica, Biología Celular y Genética, gracias al desarrollo de herramientas *ad hoc* y fáciles de usar en experimentación biológica molecular han permitido incorporar estas nuevas técnicas a la investigación nutritiva que pasó en muy poco tiempo de ser una práctica monótona y repetitiva a convertirse en un quehacer atractivo y gratificante. Esto ha posibilitado un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en las interacciones de genes específicos con el aporte nutricional y otros factores del estilo de vida que influyen en la expresión génica de células individuales y de tejidos, todo lo cual se refleja finalmente en la salud.

Por otra parte, la producción alimentaria es muy compleja y variable a nivel mundial. En los países industrializados las materias primas de los productos alimenticios expuestos a la venta en tiendas, supermercados, establecimientos de autoservicio y similares, proceden de todos los continentes y se procesan siguiendo tecnologías muy variadas e integradas, cuyos desarrollos industriales en nada se parecen y poco tienen en común con los de las naciones del tercer mundo, cuya agricultura primitiva ni siquiera llega al nivel de autosuficiencia. Estas diferencias se observan igualmente en los sistemas de comercialización que son rutinarios o casi inexistentes en algunos países de África, América Central y Asia y en cambio, en los industrializados están regulados por estándares de buenas prácticas comerciales, muy estrictos, establecidos por agencias nacio-

nales e internacionales, tal es el caso de las empresas multinacionales que operan a nivel mundial.

Los alimentos parcialmente dañados, los alterados por insectos, roedores o aves, los contaminados con microorganismos patógenos y en general los de baja calidad, además de inaceptables para los consumidores causan graves pérdidas económicas y dañan en ocasiones la reputación de empresas, de sectores de producción primaria e incluso de países productores y exportadores. Durante los últimos decenios la legislación y reglamentación alimentarias sobre seguridad y control de calidad de los alimentos se ha ido endureciendo a medida que se iban haciendo más complejos los sistemas de adquisición de materias primas y los de producción, procesado, envasado y comercialización de los productos alimenticios.

Como reportajes mediáticos los productos alimenticios suelen ser prioritarios y muchas veces al buscar el sensacionalismo, en lugar de la información basada en la evidencia científica, han causado hondas preocupaciones en la población y en las autoridades sanitarias. De otra parte, la disponibilidad de facilidades informáticas y de acceso a Internet han dado lugar en todo el mundo a que las alarmas alimentarias y singularmente las que se refieren a seguridad de los alimentos, alcancen gran resonancia en los países que cuentan con asociaciones de consumidores bien implantadas, activas y organizadas. Piénsese, por ejemplo, en el accidente de Chernobyl y la contaminación subsiguiente de los alimentos con radionúclidos, en la encefalopatía espongiforme bovina o "mal de las vacas locas" (BSE), en los brotes de listeriosis, en los de criptosporidiosis transmitidos por los alimentos y por el agua, en la presencia de acrilamida, en los productos horneados de Suecia y más recientemente, en China en la presencia de melamina en productos lácteos deshidratados de uso en alimentos infantiles.

Por todo lo expuesto se necesita contar con un sector agroalimentario dinámico que usando tecnologías compatibles con un medio ambiente sostenible proporcione, en cantidades suficientes, alimentos seguros y de gran calidad higiénica y comercial. Se requiere para ello evidencia científica y gran confianza, tanto en la industria alimentaria como en los organismos sanitarios gubernamentales, además de recursos humanos y científicos capacitados para evaluar y controlar los problemas actuales y futuros y para asegurar que la calidad y seguridad del aporte alimentario alcanza un nivel más que aceptable. En los capítulos de esta monografía titulada *Aspectos Higiénicos de los Alimentos Microbiológicamente Seguros* se estudian con profundidad algunos aspectos higiénicos que, directa o indirectamente condicionan la producción de alimentos seguros.

Como coordinador me siento afortunado por contar entre los autores de la monografía con la profesora Ana Troncoso, Directora de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y prestigiosa catedrática de Bromatología de la Universidad de Sevilla, donde ha desarrollado una gran actividad docente e investigadora. Es autora del primer capítulo **Alimentos seguros y agencias de seguridad alimentaria**, en el que presenta una visión general del nacimiento de las agencias de seguridad, objetivos de las mismas, actividad ejecutiva y consultiva, dispositivos técnicos y legales que les sirven de soporte y otros. Se trata de una exposición seria y detallada, descrita con un lenguaje muy pedagógico.

El profesor Rodríguez Gómez, del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), estudia en el capítulo 2 las **Consecuencias higiénicas de la alteración de los alimentos**. Después de analizar la alteración en el contexto de la higiene alimentaria, se refiere *in extenso* a los factores que la condicionan, con especial énfasis en los microorganismos a cuyo metabolismo en los distintos nutrientes dedica varias páginas. Analiza luego el papel "indicador" de la alteración como predictor de la presencia de microorganismos patógenos y acaba estudiando los efectos negativos de la alteración en la salud. Es un trabajo denso, bien estructurado y de fácil lectura.

Los métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos, que constituyen el capítulo 3 de la monografía, ha sido escrito por la catedrática, profesora Rosario Martín de Santos. Su introducción es una magnífica revisión de los agentes etiológicos ("clásicos y emergentes") de las toxiinfecciones alimentarias y de su interés en salud pública por las posibles secuelas crónicas que han causado en sectores sensibles de la población, especialmente inmunodeprimidos, ancianos, niños y embarazadas.

Los avances en las técnicas automatizadas de análisis, tanto inmunológicas como genéticas, están magistralmente descritas y su exposición es difícilmente superable. En su conjunto este capítulo es una puesta al día de los aspectos más recientes y de mayor futuro del análisis microbiológico aplicado a los alimentos.

Nuestro Académico numerario, profesor Ribas Ozonas, Jefe (jubilado) del Área de Toxicología Ambiental del Instituto de Salud Carlos III, es el autor del capítulo 4, **Biocidas: Datos sobre su evaluación para la salud, industria alimentaria e impacto ambiental**. Es una revisión muy bien esquematizada del concepto, clasificación y nomenclatura de los biocidas, de su toxicología y metabolismo, así como de los métodos de valoración del riesgo derivado de su empleo. Hace un detallado estudio de los ensayos toxicológicos y ecotoxicológi-

cos, refiriéndose después a las aplicaciones de los biocidas y a las pruebas de evaluación más corrientes. Termina con un apartado sobre "el biocida ideal" y sus aplicaciones. En la metodología seguida en la exposición de este capítulo se aprecia la autoridad científica de un gran profesional.

El capítulo 5, **Las biopelículas microbianas, un búnker de uso habitual**, ha sido desarrollado por las Dras. San José Serrán, catedrática del departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la UCM y su discípula Belén Orgaz Martín. Este capítulo 5, de título impactante y no gran extensión estoy seguro que atraerá la atención del lector curioso, especie más bien rara en la España actual. Comienza explicando qué son, de qué se componen y dónde se forman las biopelículas, continúa con la etiología de la matriz adhesiva y su composición, pasando a continuación a estudiar los factores y etapas que intervienen en su formación, incluida la fase de desprendimiento.

También analizan los roles de las biopelículas, su heterogeneidad, la gran resistencia de su microbiota a los biocidas y su tendencia a asociarse con otras especies (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas fluorescens*). Describen los biofilms "malos" y "buenos" y acaban señalando que estos estudios "están llevando a una revisión general de las normas higiénicas de la industria alimentaria" y a diseñar también programas de limpieza y desinfección "a medida" para las distintas industrias procesadoras de alimentos.

El capítulo 6, **Bacterias patógenas emergentes trasmisibles por los alimentos** lo firma el profesor Hernández Cruza, catedrático del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UCM.

Después de una introducción sobre la heterogénea microflora que se desarrolla en los alimentos, trata de los emergentes más conocidos, refiriéndose a continuación a los factores que favorecen su presencia en los alimentos y a la transferencia génica horizontal de factores de virulencia y resistencias antimicrobianas, insistiendo especialmente en las islas genómicas. La patogenicidad y secuelas debidas a bacterias emergentes las estudia, asimismo pormenorizadamente, lo mismo que las de otras posibles especies emergentes actuales o futuras. Termina exponiendo las medidas de prevención y control. Es un capítulo profundo y muy bien trabajado, de lectura entretenida.

La listeriosis. Una zoonosis emergente de transmisión alimentaria constituye el capítulo 7, que ha sido escrito por el profesor Domínguez Carmona, Académico de número de las RR.AA. nacionales de Medicina y de Farmacia y Catedrático Emérito de la Universidad San Pablo-CEU de Madrid.

Es una excelente revisión de una enfermedad que, en palabras del autor, "es atípica, de origen alimentario y cuyo interés en salud pública deriva de su gravedad y alta mortalidad (20-30% de los casos)". Añade que esto no impide que el 2-10% de la población humana albergue listerias en sus heces sin que los portadores muestren efectos adversos en su salud. Hace una pequeña historia de la enfermedad y de su agente causal, *Listeria monocytogenes*, y entra de lleno en su microbiología y reservorios, poniendo un especial énfasis en los alimentos como transmisores. El medio ambiente y la ecología de *L. monocytogenes*, también son objeto de su atención. La biología de este agente, su patogenia y virulencia los revisa sin prisas y por último estudia el control y la prevención de la listeriosis de origen alimentario. La gran experiencia del Dr. Domínguez Carmona y sus muchos años de entrega a la Medicina Preventiva se dejan notar en todo el texto.

El capítulo 8 lleva por título ***Cryptosporidium* y *Toxoplasma*. Dos importantes protozoos parásitos transmisibles por los alimentos y el agua**. Se trata de un capítulo con dos partes bien diferenciadas, a saber, *Parte I. Criptosporidiosis* y *Parte II. Toxoplasmosis*. Ambos géneros, sobre los que se ha escrito mucho en las últimas tres décadas, tienen un gran interés en salud pública al afectar a la especia humana y a los animales, pero *Cryptosporidium* es, además, muy ubicuo y ha dado lugar a graves pérdidas económicas al contaminar los depósitos de abastecimiento de agua de ciertas de ciertas grandes ciudades. Por su parte, *Toxoplasma* no es tan ubicuo como el anterior, pero dado el papel que juegan los gatos domésticos en su transmisión y que si se contagian las mujeres embarazadas puede ocasionarles aborto y caso de llegar el feto a término, dañar gravemente al recién nacido, se comprende la gran atención que le prestan las autoridades sanitarias. Su autor es Bernabé Sanz Pérez, editor de esta monografía y Académico de número de la RANF.

El profesor Castañeda Martín, Catedrático de Ingeniería Química de la Universidad Politécnica de Madrid y Académico correspondiente de la RANF es el autor del capítulo 9, **Diseño higiénico del equipo de procesado de alimentos**. Como señala en la introducción "la higiene resulta esencial para conseguir alimentos inocuos y de buena calidad" y añade poco después que la concepción higiénica de los equipos tiene una triple finalidad: reducir la contaminación microbiana, facilitar la limpieza, desinfección y enjuagado, y finalmente, favorecer la conservación y el mantenimiento. Después se refiere a las directivas de la UE sobre requisitos higiénicos del equipo y de los materiales necesarios (aceros inoxidables, aluminio y sus aleaciones, materiales poliméricos, etc.), llamando la atención sobre las exigencias de la directiva 2006/42/CE, la más reciente, que modifica parcialmente la legislación anterior y que tiene por objeto cómo deben diseñarse y fabricarse las máquinas destinadas a los productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos.

A continuación describe los principios generales de diseño (facilidad de desmantelamiento y montaje, accesibilidad, drenaje y otros) y por último trata con gran detalle de las principales operaciones del procesado de alimentos y los equipos empleados, sin olvidarse del diseño higiénico de los sistemas auxiliares. En fin, una verdadera lección de quien en lenguaje sencillo y ameno es un auténtico maestro.

Por último, pero no menos importante, el capítulo 10, **Legislación de alimentos europea y española**, se debe al Dr. Arranz Recio, Director General del Foro Interalimentario y doctor en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid.

Fue director ejecutivo de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y por tanto, se mueve como en casa propia por las dependencias de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y por el laberíntico mundo de la Comisión y del Consejo de la UE, cuyos vericuetos burocráticos le son muy familiares. Consecuentemente es una de las personas que en mejor posición se encuentra para abordar un tema de legislación alimentaria europea y española, que en palabras suyas "dista mucho de ser estática".

Añade que para escribir este capítulo ha preferido una exposición analítica mejor que descriptiva para permitir así a sus lectores "conocer la evolución del marco legal alimentario y más que los resultados, las razones hoy vigentes pero derogables quizá en pocos meses". Creo que lo ha conseguido al mostrar en 48 páginas todo el marco legal que puede aplicarse actualmente en España a los alimentos para asegurar una buena valoración y gestión del riesgo alimentario.

Esperamos que esta publicación resulte útil y estimulante para cuantos están interesados en los alimentos microbiológicamente seguros y muy especialmente para quienes en la Administración, en el sector agroalimentario o desde la docencia en institutos y colegios y en las profesiones sanitarias se preocupan por el bienestar del ser humano.

Como coordinador y en nombre de los autores, agradecemos a la Real Academia Nacional de Farmacia, sobre todo en la persona de su Presidenta, Prof. Dña. María Teresa Miras Portugal, el apoyo y estímulo que nos ha dado en todo momento para llevar a buen fin la monografía. Una vez más hay que agradecer a la RANF y a la Fundación "José Casares Gil" la financiación que ha permitido publicar esta nueva monografía. Asimismo a la Sección Quinta y a su Presidente, Dr. D. Mariano Esteban Rodríguez gracias por su ayuda en todo tiempo. Finalmente a D. Jesús Sánchez Nogueiro, del Servicio de Composición y Edición, gracias por su inestimable ayuda y dedicación.

Bernabé Sanz Pérez
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

1. Alimentos seguros y agencias de seguridad alimentaria

ANA TRONCOSO

Directora de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)

1. ALIMENTOS SEGUROS

Existen múltiples publicaciones en las cuales se recoge la definición de alimento. Si se consulta la normativa vigente nos encontramos que a nivel internacional, el Codex Alimentarius dispone de una definición del concepto alimento. Con la entrada en vigor el 1 de febrero de 2002 del Reglamento CE nº178/2002, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos de la legislación alimentaria, se homogeniza a nivel comunitario la definición establecida para alimento recogida en el mencionado Reglamento, y éste se define como "cualquier sustancia o producto destinado a ser ingerido por los seres humanos o con probabilidad razonable de serlo, tanto si han sido transformados entera o parcialmente, como si no".

Dentro de esta definición de alimento, quedan incluidas las bebidas, la goma de mascar y cualquier sustancia, incluida el agua, incorporada voluntariamente al alimento durante su fabricación, preparación o tratamiento. Asimismo, quedan excluidos de esta definición los piensos, los animales vivos salvo que estén preparados para ser comercializados para consumo humano, las plantas de la cosecha, los medicamentos, los cosméticos, el tabaco y derivados, los estupefacientes, los residuos y contaminantes.

En enero de 2000, en respuesta a las crisis alimentarias de los años 90 (Encefalopatía espongiforme bovina, fiebre aftosa, dioxinas), la Comisión Europea publicó un Libro Blanco sobre seguridad alimentaria que marca un hito impor-

tante en la consideración de la legislación europea sobre esta cuestión. El nuevo marco jurídico cubre el conjunto de la cadena alimentaria —«de la granja a la mesa»— siguiendo un enfoque global y armonizado. De acuerdo con esta lógica, en la seguridad alimentaria inciden la alimentación y la salud animal, la protección y el bienestar de los animales, los controles veterinarios, los controles fitosanitarios y la preparación e higiene de los productos alimentarios. El Libro Blanco destaca asimismo la necesidad de instaurar un diálogo permanente con los consumidores con fines informativos y educativos.

El Reglamento fundador de la nueva legislación alimentaria, adoptado en febrero de 2002, define seis principios generales fundamentales: la afirmación del carácter integrado de la cadena alimentaria; el análisis del riesgo como fundamento esencial de la política de seguridad alimentaria; una separación clara entre el análisis y la gestión de los riesgos; la responsabilidad de los operadores económicos; la garantía de la trazabilidad de los productos en todas las etapas de la cadena alimentaria; el derecho de los ciudadanos a una información clara y precisa. Así mismo, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como organismo de referencia para la evaluación de riesgos. Entre sus tareas principales figuran las de emitir dictámenes científicos independientes sobre cuestiones relacionadas con la seguridad alimentaria, recopilar y analizar datos sobre los riesgos potenciales o emergentes y asegurar un diálogo permanente con el público en general. Con la publicación del Reglamento CE 178/2002 se establecieron de este modo los requisitos básicos de la seguridad alimentaria a nivel del mercado comunitario. Así el Artículo 14 del mismo, indica que un alimento es seguro si cumple las disposiciones comunitarias específicas que regulen la inocuidad de los alimentos, considerándolo seguro en los aspectos cubiertos por esas disposiciones. El hecho de que un alimento cumpla con las disposiciones específicas legislativas que le sean aplicables no es impedimento para que las autoridades competentes puedan tomar las medidas adecuadas a la hora de imponer restricciones a su comercialización o exigir su retirada del mercado, si existen motivos suficientes para pensar que, a pesar de su conformidad, el alimento no es seguro.

En el marco de la obligación de los operadores económicos de poner en mercado productos que sean seguros, estos deberán asegurar que los alimentos y piensos cumplen con la legislación alimentaria, y en caso de que se sospechase o se tuviese la certeza de que el alimento no fuese seguro iniciar la recogida /retirada si fuese necesario e informar de las acciones llevadas a cabo a las Autoridades competentes y a los consumidores.

Para establecer si un alimento es seguro, es importante tener en consideración los probables efectos inmediatos a corto y largo plazo de ese alimento, no

sólo para la salud de la persona que lo consume, sino también para la de sus descendientes; los posibles efectos tóxicos acumulativos y la sensibilidad particular de orden orgánico de una categoría específica de consumidores, cuando el alimento esté destinado a ella.

Por otra parte es imprescindible el cumplimiento por parte de las empresas de los principios de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), cuyas fases son:

- Análisis de peligros.
- Medidas preventivas.
- Punto crítico de control.
- Límites críticos.
- Vigilancia.
- Medidas correctoras.
- Verificación del sistema.

La Comisión del Codex Alimentarius aprobó en 1993 las directrices para la aplicación del APPCC y desde 1997 están incluidas en el Código Internacional Recomendado de Prácticas-Principios Generales de Higiene de los Alimentos del Codex. El APPCC tiene como requisito para su implementación las guías de prácticas correctas, que se encuentran legisladas en la gran mayoría de países. El Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimentarios legisla las medidas y condiciones necesarias para controlar los peligros y garantizar, por parte de los agentes económicos del sector alimentario, que todas las etapas del proceso de las que sean responsables, desde la producción primaria hasta la puesta a la venta o el abastecimiento al consumidor final, se llevarán a cabo de forma higiénica de acuerdo con lo dispuesto en el Reglamento.

Aunque la legislación en materia de higiene introduce cierta flexibilidad dejando capacidad a los Estados Miembros de exceptuar empresas en base a su tamaño, su localización geográfica o sus características de "tradicionalidad", los principios básicos de higiene de los alimentos eran exigidos a todo establecimiento alimentario, sin tener en cuenta la naturaleza de su actividad. En la actualidad, se tiende a la flexibilización de esta exigencia y a la reducción de los puntos críticos a controlar para que la acción sea más eficaz y eficiente.

1.1. El análisis de riesgos

El análisis de riesgos debe ajustarse a un método estructurado que comprenda los tres componentes distintos, pero estrechamente vinculados del análisis de riesgos (evaluación de riesgos, gestión de riesgos y comunicación de riesgos). Los tres componentes del análisis de riesgos deben documentarse de manera completa, sistemática y transparente. Aun respetando la legítima preocupación por preservar la confidencialidad, la documentación debe ser accesible a todas las partes interesadas. Entre la evaluación de los riesgos y su gestión debe existir una separación funcional a fin de garantizar la integridad científica de la evaluación de riesgos, evitar la confusión entre las funciones que deben desempeñar los evaluadores de riesgos y los encargados de la gestión de los mismos, y atenuar cualquier conflicto de intereses. No obstante, se admite que el análisis de riesgos es un proceso iterativo y que, para su aplicación práctica es esencial que exista una interacción entre los encargados de la gestión de riesgos y los evaluadores de riesgos.

La precaución es un elemento inherente al análisis de riesgos. En el proceso de evaluación y gestión de los riesgos que entrañan los alimentos para la salud humana, existen múltiples fuentes de incertidumbre. El grado de incertidumbre y variabilidad de la información científica disponible debe tomarse explícitamente en cuenta en el análisis de riesgos. Las hipótesis utilizadas para la evaluación de riesgos y las opciones en materia de gestión de riesgos que se han seleccionado deben reflejar el grado de incertidumbre y las características del peligro. Este principio es una aproximación a la gestión de riesgos alimentarios en situación de incertidumbre científica, estableciendo actuaciones ante un riesgo potencialmente grave. Se basa en la transparencia en la adopción de medidas proporcionales al riesgo y en una valoración previa de las ventajas e inconvenientes de las medidas a tomar. Las medidas de gestión del riesgo en esta situación son por tanto provisionales hasta una mayor certidumbre científica.

La determinación de una política de evaluación de riesgos debe incluirse como componente específico de la gestión de riesgos. La política de evaluación de riesgos será establecida por los encargados de la gestión de riesgos antes de que tal evaluación se realice y, en consulta con los evaluadores de riesgos y todas las demás partes interesadas. Este procedimiento tiene por objetivo garantizar un proceso de evaluación de riesgos sistemático, completo, imparcial y transparente.

El mandato encomendado por los encargados de la gestión de riesgos a los evaluadores de riesgos debe ser lo más claro posible. En caso de necesidad, los

encargados de la gestión de riesgos deben pedir a los evaluadores de los mismos que valoren las modificaciones que podrían sufrir los riesgos como consecuencia de las distintas opciones posibles para su gestión. El principal problema se plantea a la hora de determinar si un alimento es seguro. Para ello, deben tenerse en cuenta una serie de factores entre los que se encuentran los siguientes: las condiciones normales de uso del alimento por los consumidores y en cada fase de la cadena alimentaria, la información ofrecida al consumidor sobre el alimento en sí, incluida la que figura en la etiqueta, u otros datos a los que el consumidor tiene por lo general acceso, sobre la prevención de determinados efectos perjudiciales para la salud que se derivan de un determinado alimento o categoría de alimentos.

1.2. La trazabilidad

En el marco de la comercialización de alimentos seguros, el reglamento marco en Higiene, Reglamento (CE) 852/2004, establece la obligatoriedad para los operadores económicos de disponer de sistemas de trazabilidad. La trazabilidad hace referencia a la capacidad de determinar el origen y el destino de cada lote de producto a lo largo de toda la cadena alimentaria.

La trazabilidad permite el control de los stocks; ayuda a la certificación de calidad de los productos; sirve para localizar, inmovilizar y retirar de forma efectiva y selectiva alimentos y piensos con riesgo; facilita los controles oficiales, la gestión de las alertas alimentarias y la comunicación del riesgo, a la vez que aumenta la confianza de los consumidores.

Los operadores de empresas alimentarias y de piensos deberán poder identificar a cualquier persona que les haya suministrado un alimento, un pienso, un animal destinado a la producción de alimentos, o cualquier sustancia destinada a ser incorporada en un alimento o un pienso, o con probabilidad de serlo. Las empresas pondrán en práctica sistemas y procedimientos que permitan poner esta información a disposición de las autoridades competentes si estas así lo solicitan y se asegurarán de que los productos dispongan de un adecuado etiquetado o identificación que facilite su trazabilidad mediante documentación.

Hay que tener en cuenta que en el sector de la transformación industrial conviven grandes empresas agroalimentarias muy tecnificadas que trabajan con gran excelencia con pequeñas empresas que deben mejorar la trazabilidad de los lotes e implantar realmente los sistemas de autocontrol.

1.3. Plan Plurianual de Control Oficial

Además de la obligación de los operadores económicos, también las autoridades competentes de los Estados Miembros deben asegurar el cumplimiento de la legislación alimentaria y efectuar las correspondientes verificaciones a través de los mecanismos establecidos en el marco del control oficial, tanto en mercado interior como en frontera. Estas tareas de control oficial se complementan con las actividades de vigilancia y seguimiento de los productos alimenticios en mercado, información al público y en caso de incumplimientos con infracciones y sanciones.

El Plan plurianual de control oficial obedece al mandato Comunitario derivado del reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales, que establece en su artículo 41 que "…*cada Estado Miembro preparará un único plan nacional de control plurianual integrado*".

Con esta disposición, se pretende garantizar la aplicación efectiva por parte de los Estados Miembros (EEMM) de lo dispuesto en:

- El Reglamento (CE) Nº 178/2002 que en su artículo 17.2, impone a los EEMM el deber de velar por el cumplimiento de la legislación alimentaria, así como controlar y verificar que los explotadores de empresas alimentarias y de empresas de piensos cumplen los requisitos pertinentes de la legislación alimentaria en todas las etapas de la producción, la transformación y la distribución, manteniendo para ello un sistema de controles oficiales.
- La normativa sobre sanidad animal y bienestar de los animales.
- La Directiva 2000/29/CE del Consejo de 8 de mayo de 2000 relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad.

El artículo 41 del Reglamento (CE) nº 882/2004 establece que cada Estado Miembro preparará un único plan nacional de control plurianual integrado que ha de ser aplicado por las distintas autoridades competentes que, en el caso de España son la Administración General del Estado, las Comunidades Autónomas y las Corporaciones Locales.

El Plan es una herramienta integral, porque aúna dos aspectos relacionados entre sí. Por un lado afecta a todos los sectores implicados en la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta llegar al suministro de los alimentos a los consumidores, y por otro hay que considerar el marco competencial en el control oficial de los alimentos, que se distribuye entre las distintas administraciones públicas en materia de salud pública y agricultura y sanidad animal, ya sea en los ámbitos nacional, autonómico o local.

En este sentido hay que tener en cuenta la Decisión 2007/363/CE que destaca la relevancia del principio de coordinación entre distintos niveles administrativos en los siguientes términos: "*Para los Estados Miembros con administraciones descentralizadas, el plan nacional de control debe precisar cómo se garantiza la coordinación entre las distintas administraciones para obtener un plan nacional de control único e integrado. Una simple compilación de los planes de las distintas autoridades competentes o sectores que no aborde la integración y coordinación de los controles oficiales relacionados, en el seno de las autoridades competentes y los sectores y entre ellos, no satisface el requisito de presentar un plan nacional de control único, integrado y plurianual*."

El Plan ha de contemplar lo siguiente:

- La cadena alimentaria en todas las fases que la componen deberá estar sometida a los programas de control oficial necesarios e interdependientes para garantizar el control de sus peligros y, en su caso, su eliminación.
- La calidad del control oficial debe estar asegurada, garantizándose la subsanación de las no conformidades con los requisitos establecidos adoptando las medidas correctoras necesarias y su posterior verificación.
- La transparencia entre las Administraciones estará garantizada, así como con los operadores económicos que vayan a ser objeto de control oficial.
- La cooperación y coordinación entre las distintas Autoridades competentes (Estatal, Autonómica y Local) en relación con todos los sectores sujetos a control oficial.

Además de la legislación comunitaria, existen en España disposiciones de carácter nacional que también se refieren a diferentes aspectos contemplados en el Plan. Entre ellas cabe destacar:

- La Ley 14/1986, General de Sanidad, que en su artículo 40 prevé que corresponde a la Administración General del Estado el establecimiento de

medios y de sistemas de relación que garanticen la información y comunicación recíprocas entre la administración sanitaria del propio Estado y la de las comunidades autónomas. Los artículos 8 y 18 consideran las actividades de protección y promoción de la salud relacionada con los alimentos como actividades sanitarias del sistema de salud. Sus artículos 54 y 70 y siguientes regulan los planes de salud de las comunidades autónomas y del Estado, la coordinación y el intercambio de información y la aprobación por el Gobierno de los planes de alcance superior a una comunidad.

- La Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal, artículo 47, a cuyo tenor por los órganos competentes de las Administraciones públicas se establecerán controles oficiales que podrán ser sistemáticos en los puntos de inspección fronterizos y en las dependencias donde se cultiven, produzcan, almacenen o comercialicen vegetales, y ocasionales, en cualquier momento y lugar donde circulen o donde estén dichos productos. Las inspecciones y programas sistemáticos de vigilancia en la fabricación, comercialización y utilización de los medios de defensa fitosanitaria, particularmente el cumplimiento de las buenas prácticas fitosanitarias, así como la vigilancia de los niveles de residuos presentes en los vegetales, productos vegetales y sus transformados, y en los alimentos preparados a base de ellos, que corresponden a los órganos competentes de las Comunidades Autónomas, serán coordinados por la Administración General del Estado, estableciendo, a tal efecto, los planes o programas nacionales de control.
- La Ley 8/2003 de 24 de abril, de Sanidad Animal (aplicable a la sanidad animal y los piensos), que en su artículo 76 dispone que por los órganos competentes de las Administraciones públicas se establecerán los controles oficiales precisos para garantizar el cumplimiento de lo dispuesto en dicha Ley. Dichos controles podrán ser sistemáticos o aleatorios en cualquier momento o lugar donde circulen o se encuentren animales o productos de origen animal. Los controles en la fabricación, elaboración, comercialización y utilización de los productos para la alimentación animal y productos zoosanitarios prestarán especial atención al cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación y al control de los niveles de residuos y de sustancias prohibidas, presentes en los animales y productos de origen animal, y en los alimentos preparados con ellos.
- La Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, que establece en

el artículo 10 que las Administraciones Públicas, en el ámbito de sus respectivas competencias, establecerán los programas o planes periódicos de inspecciones y controles oficiales que se precisen, sin perjuicio de las inspecciones que resulten necesarias ante situaciones o casos singulares.

- El Real decreto 1945/1983, de 22 de junio, por el que se regulan las infracciones y sanciones en materia de defensa del consumidor y de la producción agroalimentaria.

El Plan es único e integrado y reúne todas las actividades de control oficial a lo largo de toda la cadena alimentaria y de todas las autoridades competentes en la materia. Es una herramienta para la mejora de todos los sistemas de control oficial existentes. La descripción de todas estas actividades pone en evidencia la solidez de la base sobre la que se sustenta la seguridad alimentaria en cada país miembro, y además señala a través de los informes anuales del plan, aquellas cuestiones que han de ser solventadas en éste o en sucesivos años, de forma que la mejora se convierta en un proceso continuo.

El Plan persigue los siguientes objetivos estratégicos:

- Mantener un elevado nivel de protección de la salud y la seguridad alimentaria.
- Prevenir las enfermedades relacionadas con los alimentos, así como reducir su incidencia y prevalencia a niveles mínimos razonables.
- Prevenir la exposición a los agentes capaces de causar enfermedades por vía alimentaria y reducir dicha exposición.
- Aumentar y mantener un nivel elevado de confianza, basada en datos objetivos, en el sistema de control oficial de la cadena alimentaria tanto por parte de la ciudadanía como por parte de los mercados nacional e internacional.

1.4. Organización de los Controles Oficiales

Los programas y sistemas de control oficial deberán definir documentalmente en cada fase de la cadena alimentaria las prioridades e intensidad de los controles. Serán las autoridades competentes de control oficial en el ámbito de sus competencias las que deberán aplicar en la práctica estos criterios de categorización del riesgo.

Los elementos de categorización del riesgo, considerados desde el inicio de la cadena alimentaria hasta la comercialización y consumo son, a título orientativo uno o varios de los siguientes:

- Incidencia sobre la salud de la población y gravedad de los efectos.
- Incidencia sobre la sanidad animal y vegetal y el bienestar animal, así como la gravedad de los efectos.
- Potencial de difusión/transmisión y dificultad de eliminación o reducción del factor de peligro.
- Percepción social.
- Influencia sobre la lealtad de las transacciones comerciales y el funcionamiento de los mercados.
- Aparición de nuevas pruebas científicas que modifiquen la evaluación del riesgo preexistente.
- Exigencias de nuevas normativas, nacionales o comunitarias.
- Recomendaciones derivadas como consecuencia de hallazgos en misiones y auditorías de la Oficina Alimentaria y Veterinaria de la Comisión Europea (OAV) y de otras actuaciones de control.
- Dependientes de resultados de actuaciones de control: Historial de la explotación, establecimiento o industria. Se tendrán en cuenta el historial de los establecimientos en cuanto al cumplimiento de la legislación sobre alimentos o piensos, la fiabilidad y efectividad de los autocontroles realizados, la localización, y cualquier otro dato que pudiera indicar incumplimientos e infracciones.
- Datos de resultados del control oficial de los años precedentes y datos de la red de alerta alimentaria y de piensos. Se considerarán los riesgos detectados en España y en otros estados miembros, los establecimientos (nuevos o recurrentes) afectados por los expedientes, los alimentos implicados y los países de origen de los productos implicados en los expedientes.

También se pueden señalar una serie de criterios específicos:

a) Dependientes del Proceso Productivo

   Se considera la incidencia o impacto potencial de agentes zoonósicos sobre la salud pública así como la situación epizootiológica en relación a dichos agentes.

Asimismo se tiene en cuenta distintos aspectos dependiendo del tipo de proceso productivo/ producción primaria: zona de captura, cría o recolección en los productos de la pesca y acuicultura, influencia del tipo de cultivo, sistema de cultivo y modalidades de transporte y almacenamiento en la seguridad de los productos vegetales destinados a la alimentación humana o del ganado, así como la existencia o ausencia de procesos posteriores a la producción primaria que eliminen o reduzcan los peligros.

b) Dependientes Del Procesado Industrial, Transformación o Elaboración

Tipo de establecimiento según la actividad que realice, y la categoría del producto alimenticio sobre cuya cadena de producción, elaboración o transformación se va a aplicar el sistema de control.

c) Dependientes Del Producto Alimentario

El alimento puede estar listo para el consumo sin necesidad de tratamiento previo o no. Hay que considerar el riesgo en función del colectivo consumidor de destino (población infantil, mayores de 65 años, embarazadas, otras poblaciones de riesgo/colectivos vulnerables).

1.5. Laboratorios de seguridad alimentaria

En cumplimiento de lo dispuesto por el Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 acerca de los métodos de muestreo y análisis (*capítulo III, artículo 11*) laboratorios oficiales (*artículo 12) y* laboratorios comunitarios y nacionales de referencia *(título III, artículos 32 y 33),* el soporte analítico de los diferentes planes de control se estructura de la siguiente forma:

1.5.1. *Laboratorios oficiales de control*

Los laboratorios que participan en el análisis de muestras oficiales aplican procedimientos autorizados internacionalmente o normas de funcionamiento basadas en criterios y métodos de análisis que hayan sido validados.

Estos laboratorios son designados por la autoridad competente para realizar el análisis de las muestras tomadas en los controles oficiales y deben estar acreditados conforme a las normas europeas: EN ISO/IEC 17025, EN 45002 y EN

45003. Las autoridades competentes podrán anular la designación cuando dejen de cumplirse las condiciones señaladas.

1.5.2. *Laboratorios nacionales de referencia*

Las actividades de los laboratorios de referencia abarcan todos los ámbitos de la legislación sobre piensos y alimentos y de la salud animal, y en particular aquellos en los que se requieren resultados precisos de análisis y diagnósticos.

Los laboratorios nacionales de referencia colaboran con el laboratorio comunitario de referencia, coordinan las actividades de los laboratorios oficiales, organizan y realizan el seguimiento de ensayos comparativos entre los laboratorios oficiales nacionales y se encargan de difundir a la autoridad competente y a los laboratorios oficiales nacionales la información suministrada por el laboratorio comunitario de referencia. Asimismo facilitan a la autoridad competente asistencia científica y técnica para la puesta en práctica de los planes de control coordinados.

1.5.3. *Laboratorios comunitarios de referencia*

Los laboratorios comunitarios de referencia cuentan con equipos, infraestructura administrativa y el personal cualificado y formado para realizar las tareas asignadas. Los laboratorios de referencia tienen en cuenta las actividades de investigación desarrolladas a nivel nacional y comunitario y disponen de personal formado para situaciones de emergencia que se produzcan dentro de la Comunidad.

Los laboratorios comunitarios de referencia para piensos y alimentos son responsables de:

a) Proporcionar a los laboratorios nacionales de referencia los detalles de los métodos analíticos, en especial de los métodos de referencia.

b) Coordinar la aplicación de los métodos analíticos por parte de los laboratorios nacionales de referencia, en particular organizando la realización de ensayos comparativos y realizando su adecuado seguimiento de acuerdo con protocolos internacionalmente aceptados.

c) Coordinar, en su ámbito de competencias, la organización práctica necesaria para aplicar nuevos métodos de análisis e informar a los laboratorios nacionales de referencia de los avances en este campo.

d) Organizar cursos de formación inicial y continua dirigidos al personal de los laboratorios nacionales de referencia y a expertos de países en desarrollo.

e) Proporcionar a la Comisión asistencia científica y técnica, sobre todo en los casos en que un Estado miembro cuestione los resultados de los análisis.

f) Colaborar con los laboratorios encargados de analizar los piensos y los alimentos en terceros países.

Por otra parte, muchos de los operadores económicos delegan en laboratorios públicos o privados el soporte analítico a sus autocontroles. Para algunos programas podrán definirse condiciones mínimas de funcionamiento que deben reunir, procedimientos de autorización y registro, o sistemas de seguimiento de su actividad por el Laboratorio Nacional de Referencia (mediante ensayos colaborativos, auditorias, etc.) o por la Autoridad Competente.

2. AGENCIAS DE SEGURIDAD ALIMENTARIA

2.1. Autoridad Europea de Segundad Alimentaria

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) depende de la Comisión Europea y se crea a raíz de la publicación del Reglamento 178/2002, que constituye su acta fundacional. Es una Agencia de la Comisión, financiada con el presupuesto comunitario y está ubicada en Parma (Italia), Su función principal es proporcionar asesoramiento científico objetivo sobre todos los temas relacionados con la seguridad alimentaria, tiene pues encomendadas la evaluación y comunicación del riesgo. En el ámbito de la UE la gestión del riesgo la lleva a cabo la Comisión Europea a través de la DG SANCO (Dirección General de Salud y Consumidores). La EFSA asesora a la Comisión Europea, Parlamento y los Estados Miembros sobre temas relacionados con seguridad de alimentos y piensos, sanidad y protección animal y vegetal, además de aspectos relativos a nutrición.

Una de las funciones mas interesantes de la EFSA es la de coordinar el desarrollo de metodologías uniformes para la determinación del riesgo, como garantía de una política homogénea de evaluación y gestión de riesgo en el seno de la UE.

Los dictámenes científicos se elaborarán a petición de los organismos pertenecientes a la Comisión Europea y al Parlamento Europeo para el desarrollo

y/o modificación de la legislación comunitaria. También pueden solicitarlo los Estados Miembros o la propia EFSA mediante auto mandato.

Posee un Comité Científico y 12 paneles, además de numerosos grupos de expertos. El órgano máximo de gestión de la Autoridad es el Consejo de Dirección y también posee un Foro Consultivo donde están representados todos los países miembros de la UE. EFSA es un organismo independiente que debe trabajar en estrecha relación con los Estados Miembros para evitar duplicidades en las actividades científicas y de evaluación y para solucionar cuestiones científicas controvertidas.

2.2. La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición es un Organismo Autónomo, adscrito al Ministerio de Sanidad y Política Social. Se crea en el año 2001 por *Ley 11/2001*, de 5 de julio, (aprobada por unanimidad). Mediante el *RD 709/2002*, de 19 de julio, se aprueba el Estatuto de la Agencia y se ordena el funcionamiento de sus Órganos de Gobierno con representación intersectorial e interinstitucional. Posteriormente en el año 2006 y mediante la *Ley 44/2006*, de 29 de diciembre, de mejora de la protección de los consumidores y usuarios la AESAN incorpora a sus funciones también competencias en materia de promoción de la salud en el ámbito de la nutrición y en especial de la prevención de la obesidad.

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) tiene como misión garantizar el más alto grado de seguridad y promover la salud de los ciudadanos, trabajando para:

- Reducir los riesgos de las enfermedades transmitidas o vehiculadas por los alimentos.
- Garantizar la eficacia de los sistemas de control de los alimentos.
- Promover el consumo de los alimentos sanos, favoreciendo su accesibilidad y la información sobre los mismos.
- Planificar, coordinar y desarrollar estrategias y actuaciones que fomenten la información, educación y promoción de la salud en el ámbito de la nutrición y, en especial, en la prevención de la obesidad.

Dentro de la AESAN, y al contrario que en muchas de las agencias europeas, se llevan a cabo los tres aspectos básicos en la Seguridad Alimentaria: la

evaluación, la gestión y la comunicación de los riesgos alimentarios. Aunque es recomendable que la evaluación del riesgo se haga independientemente a la gestión del mismo, en la creación de la AESAN se quiso integrar los tres aspectos dentro de un mismo organismo, habida cuenta de la múltiple descentralización de competencias en el Estado español, la AESAN se configura como un ente de cohesión, coordinación y representatividad internacional. Los principios del funcionamiento de la AESAN se basan en la independencia, transparencia y excelencia científica.

Sus funciones se pueden resumir de la siguiente manera:

- Coordinar las actuaciones de las Administraciones con competencias en seguridad alimentaria y nutrición.
- Instar actuaciones ejecutivas y normativas de las autoridades.
- Elaborar y promover estudios y trabajos de investigación.
- Representar la posición de España en los asuntos de seguridad alimentaria y nutrición que se traten en la Unión Europea y en los organismos internacionales.
- Promover cuantas acciones de información sean precisas para consumidores y usuarios.
- Coordinar el funcionamiento de las redes de alerta.
- Prestar asesoría técnica.
- Promover la salud en el ámbito de la nutrición y en especial la prevención de la obesidad.
- Actuar como laboratorio nacional de referencia.

El Comité Científico de la AESAN es el órgano encargado de asumir las funciones de evaluación de los riesgos alimentarios, proporciona dictámenes científicos y coordina el trabajo de los grupos de expertos. Está constituido por 20 miembros de reconocida competencia científica en distintas áreas vinculadas con la seguridad de los alimentos: toxicología, microbiología, epidemiología, biotecnología, inmunología y alergología, nutrición humana, farmacología, procesos tecnológicos, análisis e instrumentación. El comité ha publicado hasta la fecha 42 informes y opiniones científicas.

Por otra parte en la AESAN se trabaja en la elaboración del soporte normativo que asegure la protección de la vida y la salud de las personas, todo ello

bajo el enfoque integrado «de la granja a la mesa» como principio general de la política de seguridad alimentaria y como objetivo fundamental está el de armonizar los requisitos nacionales a fin de garantizar la libre circulación de alimentos y piensos en la Unión Europea.

3. AGENCIAS DE SEGURIDAD ALIMENTARIA EUROPEAS

Con la aparición del Reglamento (CE) 178/2002 y consecuente creación de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) se crean muchas agencias de seguridad alimentaria en los distintos estados miembros, aunque algunas agencias son anteriores a esta legislación. Estas agencias, dependiendo la estructura política y organizativa del país, tienen variadas estructuras y objetivos. A pesar de esta diversidad son casi siempre los organismos responsables de interrelacionar con la EFSA compartiendo estrategias y conocimientos en materia de evaluación de riesgos.

La AFSSA (Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Alimentos), comparte con la EFSA sus funciones, siendo una organización pública independiente dedicada a la evaluación científica, la monitorización y las alertas. Cubre los riesgos de toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta el consumidor y es una de las agencias europeas con mayor número de recursos con más de 1.100 empleados, 11 laboratorios y un presupuesto anual de 100 millones de euros.

La *Food Standard Agency* (FSA) británica creada en el 2000 lleva a cabo tanto el control oficial como la evaluación y comunicación del riesgo, y también incluye toda la cadena alimentaria. Dentro de ella, pero constituida como Agencia Ejecutiva, el Servicio de Higiene de Carnes (*Meat Hygiene Service*) realiza las labores de inspección en mataderos.

El Instituto Superior de Sanidad Italiano (ISS), perteneciente al Ministerio de Sanidad, es la organización responsable en esta materia en Italia. Se crea en el 2003 y cubre las labores de inspección, monitorización y certificaciones. También lleva a cabo tareas de investigación y formación.

La *Food Safety Authority of Ireland* (FSAI), establecida en 1999, es principalmente un ente de coordinación de la aplicación y ejecución de la normativa alimentaria y también de evaluación de riesgos con comité científico que coordina esta materia entre otras instituciones y empresas del sector.

La *Autoridad Holandesa* (WWA) se crea en el 2002 y aunque en origen pertenecía al Ministerio de Sanidad en la actualidad se encuadra en el de Agri-

cultura. Sus labores, que abarcan también toda la cadena alimentaria, incluyen supervisión, actividades de evaluación y la comunicación de riesgos. Es un ente de cohesión entre los ministerios implicados en la materia y de representación internacional.

La *National Food Adminstration de Suecia* es un organismo autónomo dependiente del Ministerio de Agricultura con la misión principal de supervisión y coordinación en materia alimentaria en un país de 21 condados con competencias en materia alimentaría. Trabaja a nivel comunitario en la elaboración de la legislación y organiza la inspección veterinaria.

En general por tanto los modelos son variados, priman las agencias con múltiples responsabilidades pero que principalmente cohesionan y coordinan la labor en materia alimentaria realizada por las distintas administraciones competentes.

4. BIBLIOGRAFÍA

- *"Principios Prácticos sobre el Análisis de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos Aplicables por los Gobiernos*" WHO-FAO, 2007. ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/Booklets/.../Risk_EN_FR_ES.pdf
- *"Guía para la aplicación del sistema de trazabilidad en la empresa agroalimentaria"* Agencia española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2009. http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/notas_prensa/reedicion_guia_trazabilidad.shtml
- *"Normativa reguladora de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria*". Textos legales 2007, Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Política Social.
- *Reglamento (CE) no 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.* Diario Oficial de la Unión Europea: DO L 31/1 de 01.02.2002.
- *Reglamento (CE) no 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios.* Diario Oficial de la Unión Europea: DO L 139 de 30.04.2004.
- *Directiva (CE) 2000/29 del Consejo, de 8 de mayo de 2000, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad.* Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 169/1 de 10.7.2000.

- *Decisión de la Comisión, de 21 de mayo de 2007, sobre directrices destinadas a ayudar a los Estados miembros a elaborar el plan nacional de control único, integrado y plurianual previsto en el Reglamento (CE) no 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo [notificada con el número C(2007) 2099] (Texto pertinente a efectos del EEE) (2007/363/CE).* Diario Oficial de la Unión Europea L 138/24 de 30.5.2007.
- *Reglamento (CE) no 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales.* Diario Oficial de la Unión Europea L 165/1 de 30.4.2004.
- *Ley 11/2001, de 5 de julio, por la que se crea la Agencia Española de Seguridad Alimentaria.* BOE número 312, 6/6/2001, 24250-24255.
- *Ley 44/2006, de 29 de diciembre, de mejora de la protección de los consumidores y usuarios*. BOE número 312 de 30.12.2006, 46601-46611.
- *Ley 14/1986, General de Sanidad*, BOE número 102 de 29/4/1986, 1986-10499.
- *Ley 32/2007, de 7 de noviembre para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.* BOE número 268 de 8/11/2007, 45914-45920.
- *Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal*. BOE número 279 de 21/11/2002, 40970-40988.
- *Ley 8/2003 de 24 de abril, de sanidad animal*. BOE número 99, 25/4/2003, 1606-16031.
- *Real Decreto 1945/1983, de 22 de junio por el que se regulan las infracciones y sanciones en materia de defensa del consumidor y de la producción agro-alimentaria*. BOE número 168, 15/7/87, 19830-19835.
- Agencia española de Seguridad Alimentaria y Nutrición: http://www.aesan.msc.es/
- Agencia Francesa: http://www.afssa.fr/
- Agencia Italiana: http://www.iss.it/
- Agencia Reino Unido: http://www.food.gov.uk/
- Agencia Irlanda: http://www.fsai.ie/
- Agencia Suecia: http://www.slv.se/
- Agencia Holandesa: http://www.vwa.nl/
- Autoridad Europea: http://www.efsa.europa.eu/

2. Consecuencias higiénicas de la alteración de los alimentos

JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ GÓMEZ

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

1. LA ALTERACIÓN DE LOS ALIMENTOS EN EL CONTEXTO DE LA HIGIENE ALIMENTARIA

Los consumidores demandan alimentos con una calidad cada vez mayor y esperan que esa calidad se mantenga durante el periodo entre su adquisición y su consumo. En nuestra vida cotidiana, se escucha con frecuencia decir que un alimento se ha "*alterado*" o "*deteriorado*". Y, sin embargo, el término "*alteración*" tiene, hasta cierto punto, una gran carga de subjetividad; así, un alimento en fase de deterioro que resulta repugnante para una persona puede constituir toda una exquisitez para otra.

En un sentido amplio, "*alteración*" es cualquier cambio en un alimento que le convierte en inaceptable para el consumidor, ya sea por cuestiones relacionadas con la calidad o con la seguridad. En consecuencia, el término "*vida útil*" se define como el tiempo en el que un alimento conservado en unas condiciones determinadas reúne tres condiciones: 1) es seguro; 2) mantiene unas características químicas, físicas, microbiológicas y sensoriales adecuadas; y 3) cumple las especificaciones nutricionales declaradas en su etiquetado (1).

Tradicionalmente, se ha considerado que la Higiene de los Alimentos debe velar por el cumplimiento de estos tres aspectos ya que, de hecho, su misión fundamental es garantizar que los alimentos sean aptos para el consumo humano. Sin embargo, la actual normativa europea relativa a la higiene de los productos alimenticios (el conocido "*paquete de higiene*") considera "*apto*" como sinónimo de "*seguro*" o "*inocuo*". Desde este punto de vista, la función de la

Higiene de los Alimentos sería garantizar la seguridad alimentaria. Se trata de una visión demasiado restrictiva ya que ignora la función del higienista en otros aspectos que resultan fundamentales para la aceptación de los alimentos, entre los que destaca la prevención y control de las alteraciones.

Todos los alimentos se alteran si no se consumen en un tiempo prudencial y/o si no se conservan en unas condiciones adecuadas. El Código Alimentario Español define "*alimento alterado*" como todo aquel "*que durante su obtención, preparación, manipulación, transporte, almacenamiento o tenencia, y por causas no provocadas deliberadamente, sufre variaciones en sus caracteres organolépticos, composición química o valor nutritivo de tal forma que la aptitud para el consumo queda anulada o disminuida, aunque permanezca inocuo*". Como se desprende de la definición, un alimento alterado puede ser inocuo pero no apto para el consumo. Por el contrario, también puede suceder que un alimento con unas propiedades sensoriales y nutricionales adecuadas represente un riesgo para la salud pública (Figura 1).

De las palabras anteriores se deduce que, en general, "*alteración*" suele tener una connotación típicamente negativa, ya sea por el desarrollo de colores, olores,

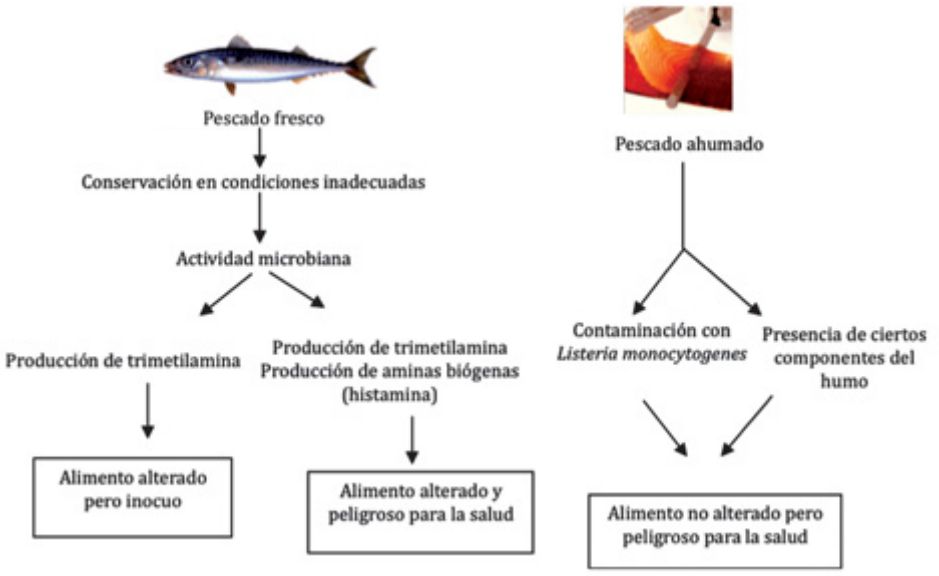


Figura 1. *La relación entre alteración y seguridad alimentaria no es siempre unívoca.*

texturas o sabores indeseables, por la reducción del valor nutricional del alimento o por la presencia de contaminantes que puedan representar un riesgo para la salud. Esta será básicamente la aproximación que se adoptará en este capítulo. Sin embargo, conviene tener presente que no siempre es así ya que algunos procesos alterativos son esenciales para que ciertos alimentos adquieran las propiedades organolépticas que les caracterizan. De hecho, el control de ciertas alteraciones que se producen de forma natural ha servido a la Humanidad para disponer de alimentos con una vida útil mucho mayor que la de las materias primas de partida, tal y como sucede con el amplio espectro de alimentos fermentados.

2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ALTERACIÓN DE LOS ALIMENTOS

La alteración alimentaria puede obedecer a diversas causas físicas, químicas y/o biológicas, entre las que destacan las siguientes (2): 1) lesiones físicas (por abrasiones, presiones, congelación, desecación…); 2) actividad enzimática de los propios alimentos y otras reacciones químicas inherentes a su composición química; 3) crecimiento y actividad metabólica de bacterias, levaduras y mohos; y 4) acción de insectos, roedores, aves y otros animales. A menudo estas causas no actúan aisladamente. Por ejemplo, las bacterias, los mohos, los insectos y la luz pueden actuar simultáneamente para deteriorar un alimento en un almacén. Igualmente, el calor, la humedad y el aire afectan tanto al crecimiento y actividad de los microorganismos como a la actividad química de las enzimas propias del alimento en cuestión. En consecuencia, las condiciones en las que se manipulan, procesan y almacenan los alimentos resultan críticas para su vida útil; sin embargo, las condiciones reales de conservación no suelen ser las más idóneas. Por ejemplo, el abuso en la temperatura sigue siendo relativamente común en la cadena de distribución y se convierte en práctica rutinaria en los hogares. Por este motivo, es importante que las industrias contemplen las características de un producto bajo el amplio espectro de condiciones de almacenamiento que, en la práctica, se observan en la cadena alimentaria.

Los factores que influyen en la velocidad y grado de alteración de un alimento se suelen clasificar en intrínsecos y extrínsecos. Los intrínsecos se refieren a las propias características del producto y están influenciados por el tipo y calidad de las materias primas, la formulación y la estructura del producto. Entre ellos cabe citar la actividad de agua, el pH, el potencial redox, el oxígeno disponible, los nutrientes, la microbiota natural, los enzimas, los aditivos, etc. Los factores extrínsecos son aquellos a los que se expone el alimento según

avanza por la cadena alimentaria: tratamientos térmicos, temperatura durante el almacenamiento y la distribución, presión, exposición a la luz, tipo de atmósfera, contaminaciones microbianas… Como se ha comentado anteriormente, todos estos factores pueden operar de una forma interactiva y, a menudo, impredecible; de hecho, las interacciones que se establecen pueden estimular o inhibir (hasta un cierto límite) los procesos alterativos. Algunos de los principales mecanismos responsables de la alteración de diversos grupos de alimentos se muestran, a modo de ejemplos, en la Tabla 1. A continuación se describirán los factores físicos, químicos y microbiológicos más relevantes en el proceso de deterioro de los alimentos.

Tabla 1. *Mecanismos de deterioro de diversos alimentos*

Alimento	**Mecanismos**	**Cambios limitantes**
Fruta fresca	Degradación enzimática Crecimiento de mohos Pérdida de humedad	Ablandamiento de la textura Mohos visibles Apariencia seca
Mermeladas	Sinéresis Oxidación	Separación del suero Crecimiento visible de mohos Pérdida de flavor
Carnes frescas	Oxidación Crecimiento microbiano	Pérdida de color, rancidez Olor y flavor desagradables
Carnes congeladas	Oxidación Sublimación del hielo	Rancidez Quemaduras
Pescado fresco	Diversas reacciones químicas Crecimiento microbiano	Alteración del aspecto Olor y flavor desagradables
Pan	Retrogradación del almidón Migración de humedad	Alteración de textura y flavor Apariencia seca; crecimiento de mohos
Café	Pérdida de compuestos volátiles Oxidación	Alteración del flavor Rancidez
Leche	Oxidación Reacciones de hidrólisis Crecimiento microbiano	Rancidez Olor y flavor desagradables
Helado	Migración de humedad Oxidación	Formación de cristales de hielo Rancidez
Yogur	Sinéresis Oxidación	Separación del suero Rancidez

2.1. Factores físicos

2.1.1. *Transferencia de humedad y/o vapor de agua*

El agua es un componente muy importante de muchos alimentos ya que, no sólo ofrece un medio para reacciones químicas y bioquímicas, sino que también participa en ellas. Su presencia afecta notablemente a las propiedades sensoriales de los alimentos, que pueden verse alteradas cuando se produce una transferencia de humedad o vapor de agua entre el ambiente y el alimento o entre los propios ingredientes de un mismo alimento (Tabla 2). Además, el agua representa un factor crítico para el crecimiento microbiano.

2.1.2. *Transferencia física de otras sustancias*

La transferencia de otras sustancias, desde o al alimento, puede comprometer la calidad del producto. Por ejemplo, la pérdida progresiva de dióxido de carbono en las bebidas refrescantes carbonatadas envasadas en botellas de polietileno conlleva la pérdida de uno de sus atributos de calidad. Igualmente, la adsorción de aromas (limonenos y otros) por parte de los materiales que recubren los envases de los zumos de naranja disminuye la intensidad del aroma a

Tabla 2. *Cambios en la calidad de algunos alimentos debidos a la transferencia de humedad y/o vapor de agua*

Producto	Cambio	Mecanismo de deterioro
Verduras frescas	Marchitado	Pérdida de humedad
Frutas frescas	Aspecto seco y poco atractivo	Pérdida de humedad
Ensaladas aliñadas	Cambios en la textura de los vegetales; cambios en la consistencia del aliño	Migración de humedad de los vegetales al aliño
Galletas y cereales de desayuno	Reblandecimiento; pérdida de la textura	Ganancia de humedad
Caramelos	Se hacen pegajosos	Ganancia de humedad
Alimentos en polvo	Apelmazamiento	Ganancia de humedad
Carne congelada	Quemaduras por frío	Transferencia de vapor de agua; sublimación del hielo

cítricos de la bebida. En sentido contrario, ciertos alimentos pueden adquirir aromas extraños o desagradables del envase o del ambiente que le rodea; los derivados del chocolate suelen ser bastante susceptibles a estos cambios debido a su alto contenido en grasa.

2.2. Cambios químicos y/o bioquímicos

A excepción de las fermentaciones intencionadas o de la maduración de la fruta después de su recolección, la mayoría de los cambios químicos y bioquímicos que ocurren en los alimentos son indeseables y, en consecuencia, afectan a su calidad y/o seguridad. Los cambios químicos y bioquímicos más relevantes son la oxidación, la hidrólisis, el pardeamiento no enzimático, el pardeamiento enzimático y las interacciones alimento-envase.

2.2.1. *Oxidación de grasas y aceites*

La oxidación de las grasas y aceites provoca el desarrollo de olores y aromas no deseables ("a rancio") en los alimentos y el rechazo (o una menor aceptación) por parte del consumidor. La rancidez oxidativa (autooxidación) es una reacción química con una baja energía de activación y, por lo tanto, no se detiene bajando las temperaturas de almacenamiento del alimento. Puede tener lugar mediante tres mecanismos: 1) el mecanismo clásico que implica la presencia de radicales libres y precisa de un catalizador (por ejemplo, cobre); 2) la fotooxidación en presencia de un agente sensibilizante, por ejemplo mioglobina, y que se desencadena por acción de la luz; y 3) la vía de la lipoxigenasa, una enzima ampliamente distribuida en los alimentos, tanto en los de origen vegetal como animal. En todos los casos, el primer producto es un hidroperóxido lipídico, que es inodoro pero que se descompone en moléculas de menor tamaño que causan la rancidez.

La oxidación rancia disminuye la calidad nutritiva del alimento debido a que los radicales libres y los peróxidos generados destruyen los ácidos grasos poliinsaturados y las vitaminas liposolubles. Estos productos intermedios también reaccionan con los enlaces sulfonados de las proteínas, disminuyendo su calidad. Así mismo, se conoce que diversas sustancias presentes en la grasa oxidada tienen efectos tóxicos. Entre ellas se incluyen los ácidos grasos peroxidados y sus metabolitos, las sustancias poliméricas y los esteroles oxidados. Los

hidrocarburos policíclicos aromáticos derivados de la pirólisis de las grasas durante asado de las carnes y pescados son agentes carcinógenos conocidos (3).

2.2.2. *Oxidación de los pigmentos alimentarios*

Todos los pigmentos alimentarios son inestables. La pérdida o cambio del color natural de un alimento no significa necesariamente que su valor nutritivo se haya reducido pero tales variaciones pueden afectar a su aceptabilidad. Un buen ejemplo es el color de la carne fresca, debido a la presencia de mioglobina. Esta proteína puede existir de tres modos: la oximioglobina (roja), la mioglobina reducida (púrpura) y la metamioglobina (marrón). La pérdida de color de la carne se debe a que la oximioglobina y la mioglobina se oxidan para producir metamioglobina. Por ello el color de la carne se emplea como uno de los indicadores de frescura.

2.2.3. *Oxidación de las vitaminas*

Las vitaminas son un grupo heterogéneo de sustancias, sin un mecanismo de destrucción común. En cualquier caso, diversas vitaminas hidrosolubles (C, B_1) y liposolubles (A, E) son sensibles al oxígeno y a la luz. Con el aumento del uso de vitaminas añadidas en muchos alimentos, como los cereales de desayuno y las bebidas isotónicas, los niveles de vitaminas declarados en el etiquetado pueden ser utilizados como indicadores de caducidad. De hecho, los productores suelen añadir una concentración superior de cada una de las vitaminas que constan en la etiqueta para compensar su degradación a lo largo de la vida útil. Esa diferencia entre la formulación y lo declarado en la etiqueta se conoce como “antienvejecimiento” del producto.

2.2.4. *Hidrólisis*

Consiste en la división de las moléculas en presencia de agua, un proceso que pueden afectar a la caducidad de algunos alimentos. Por ejemplo, el aspartano es un edulcorante de gran intensidad utilizado en los refrescos “*light*” y otros productos bajos en calorías. En condiciones adecuadas de temperatura y pH se hidroliza, lo que hace que el producto sea cada vez menos dulce. Esta pérdida de dulzor puede ser un factor limitante de la caducidad.

La hidrólisis de los triglicéridos libera ácidos grasos de cadena corta que confieren olores desagradables (rancio) a los alimentos. La enzima habitualmente implicada es una lipasa o estearasa. La rancidez hidrolítica afecta principalmente a productos que tengan aceites láuricos, como el de palma y coco. Entre los ácidos grasos que se liberan destacan el cáprico, el láurico y el mirístico, que confieren aroma a jabón. Por ello el enranciamiento hidrolítico se conoce también como rancidez jabonosa. Las lipasas también se encuentran en cereales y productos de molienda como el trigo integral, el salvado de trigo y arroz, la avena o el arroz integral. El tratamiento habitual para inactivar la enzima y estabilizar estos productos es el tratamiento térmico, que resulta inadecuado para los productos integrales. Cuando la rancidez se desarrolla en los productos lácteos, se suele deber o bien al uso de leche de baja calidad o a la contaminación de la leche durante o después del procesado. Las alteraciones hidrolíticas enzimáticas también pueden producirse en la carne cuando existe crecimiento microbiano, pero no son muy comunes. Ocasionalmente, este tipo de enranciamiento puede ser deseable, como sucede en la elaboración de algunos quesos de sabor fuerte tipo Stilton.

2.2.5. *Reacción de Maillard (pardeamiento no enzimático)*

La reacción de Maillard es un mecanismo de pardeamiento no enzimático que se origina entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carbonilo de un azúcar reductor. Se trata de una de las reacciones más típicas en los alimentos calentados aunque también se ha observado en sistemas que no estaban expuestos a calentamiento, incluyendo productos almacenados a bajas temperaturas. Las características de estos productos, así como la tasa de pardeamiento que llegan a alcanzar, dependen de varios factores, como la naturaleza y la razón molar de los reactantes, contenido de humedad, pH y temperatura, entre otros. La reacción se ve facilitada a temperaturas altas, en condiciones alcalinas y en presencia de fosfatos. Se caracteriza por un pardeamiento acompañado de una pérdida del valor nutritivo del alimento, especialmente por la pérdida de lisina, un aminoácido esencial que reacciona rápidamente con los azúcares reductores. Además, algunos de los productos resultantes de la reacción de Maillard poseen efectos tóxicos y carcinogénicos. Entre los alimentos más sensibles a este proceso alternativo destacan las frutas y vegetales deshidratados, el puré de patata, el huevo en polvo y la leche en polvo. Las consecuencias de los productos de reacción de Maillard sobre la salud se contemplarán posteriormente.

2.2.6. *Pardeamiento enzimático*

El pardeamiento de algunas frutas, verduras, hortalizas y setas (manzanas peladas, plátanos, lechuga, champiñón laminado) es una alteración debida a la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos, un proceso catalizado por la enzima polifenoloxidasa o fenolasa. Los factores más importantes que afectan a la velocidad del pardeamiento son las concentraciones de fenolasa activa y de compuestos fenólicos, el pH, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno en el tejido. En ciertos alimentos, como las uvas pasas o las hojas de té fermentadas, este pardeamiento es deseable ya que puede mejorar sus propiedades sensoriales.

2.2.7. *Cambios químicos inducidos por la luz*

En el caso de los cambios inducidos por la luz, los factores más importantes son la longitud de onda de la luz, su intensidad, la duración de la exposición, la presencia de agentes sensibilizantes, la temperatura y el oxígeno disponible. Los cambios finales dependen de cada alimento pero, en general, los más conocidos son los siguientes:

1. Fotooxidación de algunas vitaminas, como el ácido ascórbico, que se descompone rápidamente en presencia de luz y oxígeno.
2. Fotooxidación de los pigmentos óxido nítricos en el jamón cocido y productos similares. En presencia de cantidades mínimas de oxígeno, la luz induce la oxidación de los pigmentos óxido-nítricos, produciendo una alteración en el color de los productos.
3. Aceleración del enranciamiento oxidativo de los alimentos. Se produce tras exposiciones prolongadas a la luz artificial, como la de los tubos fluorescentes en los supermercados. Afecta a productos como las patatas fritas o las galletas. Por este motivo, la mayoría de los productos de aperitivo se envasan con papeles metalizados.
4. Fotodescomposición del aspartano. En solución acuosa tiene una estabilidad limitada y su descomposición se ve acelerada por la luz.

3. MICROORGANISMOS ALTERANTES

La alteración de los alimentos constituye un grave problema económico en todo el mundo y, en muchas ocasiones, se debe al crecimiento no deseado de

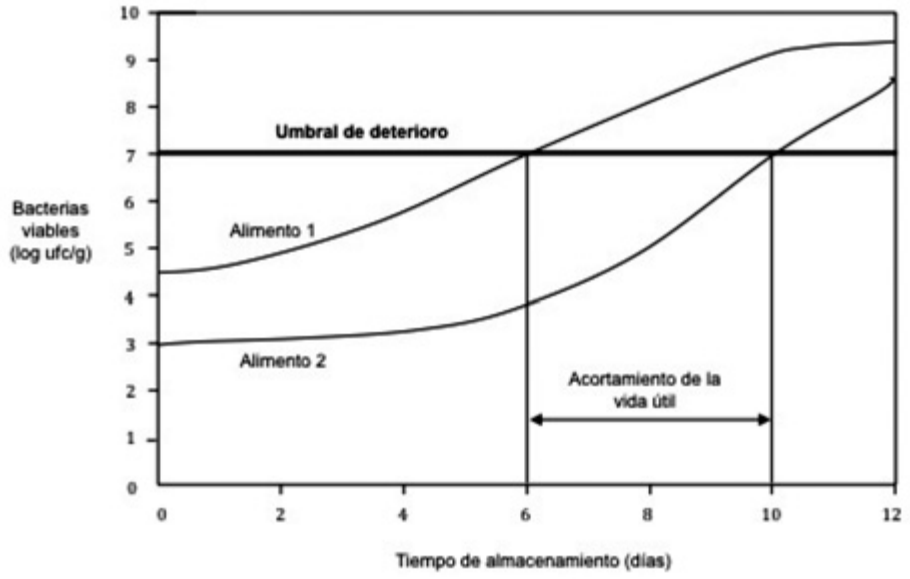
microorganismos que, durante su metabolismo, producen compuestos volátiles detectables por los sentidos del gusto y del olfato. En principio, y con las salvedades que se comentarán posteriormente, un alimento alterado no es peligroso pero carece de la calidad que de él esperan los consumidores; por lo tanto, se trata de un problema de calidad y no de seguridad. Los términos "alterado" e "inalterado" son subjetivos puesto que la aceptación alimentaria depende de lo que el consumidor espera. Así, la producción de ácido acético durante el almacenamiento del vino es rechazable pero su síntesis a partir del vino es necesaria para la obtención de vinagre.

Muchas materias primas empleadas en la elaboración de alimentos contienen su propia microbiota natural. Además, durante las operaciones de procesado y distribución, los alimentos pueden contaminarse con una gran variedad de microorganismos. Su composición química y las condiciones en las que se encuentren pueden favorecer el crecimiento y predominio de algunos de ellos y conducir a la alteración alimentaria. En general, cuanto mayor sea la carga bacteriana inicial del alimento, más breve será su vida útil debido al aumento de las actividades microbianas (Figura 2). La alteración no sólo se debe al crecimiento microbiano visible sino también a la producción de metabolitos finales que originan olores, colores y/o sabores repugnantes, gas, limosidad o pérdida de la textura normal. Obviamente, los signos de alteración varían notablemente dependiendo de los alimentos, su carga microbiana y las condiciones ambientales.

Entre las bacterias alterantes Gram-negativas destacan diversas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella* y *Aeromonas.* Durante el almacenamiento en frío, pueden alterar todos aquellos alimentos caracterizados por una gran actividad de agua y un pH cercano a la neutralidad y que se suelen conservar en un ambiente aerobio (leche y productos lácteos, carnes, pescados, mariscos, huevos...). Muchos de estos microorganismos producen pigmentos y proteasas y lipasas termoestables y, en consecuencia, son capaces de producir olores y sabores repugnantes incluso cuando las células vegetativas han sido destruidas mediante un tratamiento térmico (por ejemplo, en la leche después de la pasteurización). También producen pigmentos en la alteración de los huevos.

Por lo que respecta a las bacterias Gram-positivas no esporuladas, destacan las bacterias lácticas (*Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp.), las acetobacterias (*Acetobacter* spp.) y *Brocothrix thermosphacta*. Muchas de ellas tienen una importancia capital en la industria alimentaria ya que forman parte de cultivos iniciadores, adjuntos o probióticos. Sin embargo también existen numerosas cepas con capacidad para alterar los ali-

Figura 2. *Efecto de la carga microbiana inicial en la vida útil. Adaptado de Forsythe (4)*



mentos fermentados o aquellos envasados en atmósferas modificadas o al vacío. La causa suele ser la producción de dióxido de carbono, un exceso de acidificación debido a la producción de ácido láctico, la producción de exopolisacáridos que originan mucosidad, viscosidad o filamentosidad o la síntesis de sustancias indeseables, como las aminas biógenas. El envasado en atmósferas modificadas y al vacío suele fomentar el predominio de este tipo de bacterias.

Entre los microorganismos alterantes Gram positivos y esporulados, diversas especies de *Bacillus* y *Clostridium* constituyen importantes agentes alterantes de los alimentos procesados térmicamente, ya que las esporas sobreviven a estos tratamientos. Por ejemplo, *B. cereus* crece en la leche pasteurizada, almacenada a 5 °C y produce la "coagulación dulce" (coagulación sin acidificación) y la "nata amarga". *B. stearothermophilus* origina la "acidificación plana" de los alimentos enlatados ya que se desarrolla produciendo ácido pero no gas por lo que la lata no se abomba; por el contrario *Cl. thermosaccharolyticum* genera gas y altera los alimentos enlatados produciendo un abombamiento del envase. Por su parte, *Desulphotomaculum nigrificans* es responsable de la alteración "maloliente sulfurosa" debida a la producción de sulfuro de hidrógeno y al consiguiente abombamiento y mal olor. *Cl. tyrobutyricum* y *Cl. butyricum* causan

el hinchamiento tardío en quesos, que se caracteriza por la formación de ácido butírico que conduce a la formación de gases y olores anómalos, con pérdida de calidad.

Las levaduras y mohos, en general, toleran mejor que las bacterias las condiciones de baja actividad de agua y/o pH ácido. Consecuentemente son alterantes típicos de alimentos como frutas, hortalizas, cereales y productos horneados. Sintetizan enzimas pectolíticas que ablandan los tejidos de las frutas y verduras ocasionando las "podredumbres blandas". Así, se estima que las especies del género *Penicillium* son responsables de más del 30% de toda la fruta alterada. Los mohos producen también esporangios pigmentados que colorean visiblemente a los alimentos. *Rhizopus nigricans* es un moho alterante del pan ("pan florecido", con manchas negras) y también lo son *Neurospora sitophila* ("pan rojizo"), *Penicillium* ("moho azul") y *Aspergillus* ("moho verde"). Las levaduras osmófilas de los géneros *Saccharomyces* y *Torulopsis* crecen a concentraciones de azúcar elevadas (65-70%) y alteran zumos, mermeladas y miel. Los hongos también causan diversos tipos de alteración cárnica, como enmohecimiento "algodonoso" debido a diversas especies de *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. y *Thamnidium* spp.

4. METABOLISMO MICROBIANO EN LOS ALIMENTOS

En general, las fases de máximo crecimiento (proceso eminentemente anabólico) y máxima actividad metabólica (proceso eminentemente catabólico) de un microorganismo determinado no suelen acontecer al mismo tiempo. Este hecho es importante para comprender la cinética de deterioro de los alimentos. Seguidamente, se exponen las principales características del metabolismo de los microorganismos, prestando especial interés a su relación con la alteración de los alimentos.

4.1. Metabolismo de carbohidratos

Los principales alimentos frescos de origen vegetal tienen una actividad de agua elevada y contienen almidón u otros compuestos de peso molecular elevado, tales como celulosa y pectina. Por este motivo, suelen ser degradados por bacterias capaces de utilizar estos constituyentes como nutrientes. Los mohos y las levaduras suelen crecer más lentamente y, en consecuencia, su importancia

es menor. Únicamente adquieren protagonismo como agentes predominantes de la alteración en los alimentos ácidos y en aquéllos ricos en carbohidratos y con una actividad de agua inferior a 0,5. Estos microorganismos emplean diversas vías metabólicas y, por consiguiente, tanto el perfil de productos finales como las concentraciones a las que se encuentran son muy variables. Entre ellos, destacan los siguientes: ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, etanol, acetilmeti1carbinol y diacetilo. Además, se puede producir ácido galacturónico por disimilación microbiana de la pectina.

En las primeras fases de la alteración microbiana de diversos alimentos refrigerados, como las carnes, los microorganismos existentes en la superficie externa son capaces de emplear los escasos carbohidratos disponibles y de sintetizar exopolisacáridos, conduciendo al fenómeno de limosidad o viscosidad superficial.

4.2. Metabolismo de proteínas y péptidos

Los péptidos y aminoácidos libres son degradados por desaminación y descarboxilación. Entre los productos finales, destacan el amoníaco, sulfuro de hidrógeno, mercaptanos, disulfuros, dióxido de carbono, ácidos grasos volátiles y alcoholes. Un aminoácido dado puede ser atacado por vías metabólicas diferentes; por ejemplo, la lisina es descarboxilada por ciertas bacterias mientras que es desaminada por otras. En algunos casos, el metabolismo de proteínas y péptidos produce los compuestos característicos de la putrefacción de los huevos y de la alteración putrefactiva de los productos marinos y de la carne de aves. En otros, como en ciertos quesos blandos madurados, la degradación de la proteína por la microbiota forma parte del proceso normal de maduración y, de hecho, este proceso se considera como muy deseable. De modo similar, el sabor "a bravío" que se desarrolla durante el colgado de las aves de caza probablemente es debido, en gran medida, a cambios proteolíticos.

Los carbohidratos ejercen una actividad "ahorradora" de proteínas en la alteración de los alimentos. En cualquier alimento que contenga un 5-10% de carbohidratos, la alteración suele ser de tipo fermentativo más que de tipo putrefactivo. Este hecho se debe a que en tales alimentos los carbohidratos son degradados rápidamente por los microorganismos glucolíticos, dando lugar a concentraciones relativamente elevadas de diversos ácidos orgánicos y, en consecuencia, inhibiendo el desarrollo de los microorganismos proteolíticos. De este modo, no se originan los desagradables productos nitrogenados propios de la degradación proteica.

4.3. Lipolisis

Muchos microorganismos poseen enzimas lipolíticos que pueden originar la alteración lipolítica de la fase acuosa de un alimento. Las lipasas hidrolizan los lípidos a ácidos grasos libres (AGLs) y glicerol. El glicerol es metabolizado rápidamente por muchos microorganismos pero los AGLs se pueden acumular y, si son de peso molecular bajo, contribuir a la alteración conocida como enranciamiento o rancidez. Los microorganismos se diferencian por la especificidad de las lipasas que producen. Por lo tanto, la naturaleza, el porcentaje de los diferentes AGLs liberados y los efectos organolépticos de la lipolisis microbiana variará en función de las cepas implicadas, de la composición en ácidos grasos y de la estructura lipídica de los alimentos. La actividad de las lipasas también se ve influida por otros factores intrínsecos. Por ejemplo, la presencia de ácido oleico o de una concentración elevada de carbohidratos suele inhibir la actividad de las lipasas. Los factores extrínsecos que influyen en la actividad de las lipasas incluyen la temperatura de almacenamiento y la disponibilidad de oxígeno. Los cambios de la temperatura influyen en los porcentajes de los diferentes AGLs producidos, mientras que el aumento de la presión de oxígeno suele aumentar la actividad lipolítica general.

La producción de rancidez por oxidación o autooxidación, en vez de por hidrólisis de las grasas, suele considerarse como una reacción química espontánea más que un proceso microbiológico. Sin embargo, pueden estar implicados microorganismos que producen metabolitos con sabores y olores desagradables, tales como peróxidos, 2,4-dienos y metil cetonas. Los microorganismos que están implicados con mayor frecuencia en la lipolisis y rancidez de los alimentos son *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., *Micrococcus* spp., *Yarrowia lipolytica, Geotrichum candidum, Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. y *Paecilomyces* spp. Aunque los productos de la degradación de los lípidos generalmente son considerados indeseables, algunos están implicados en el desarrollo de sabores deseables en productos tales como quesos, embutidos crudos madurados y jamón curado.

4.4. Otros metabolitos microbianos que afectan negativamente a la aceptabilidad de los alimentos

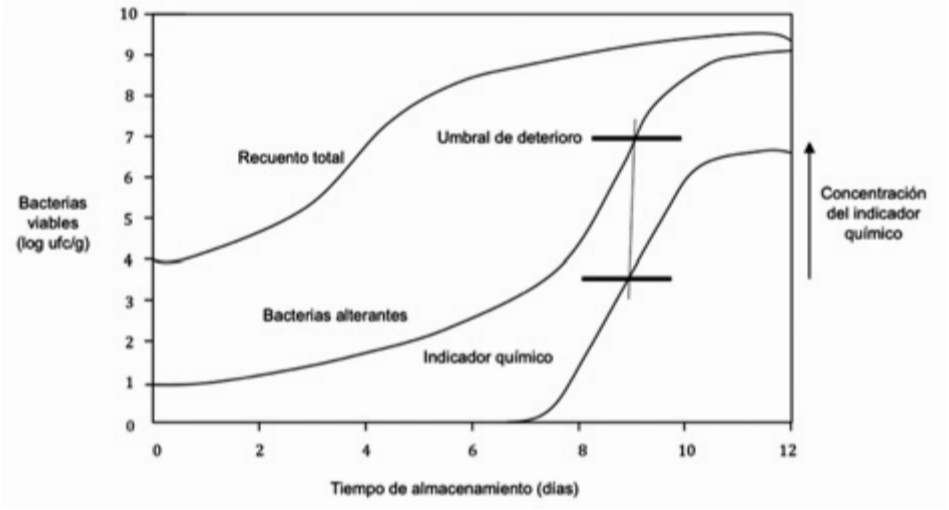
Además de los procesos anteriores, en los alimentos pueden tener lugar muchos otros cambios de origen microbiológico que contribuyen a la alteración.

Así, la adición de sorbatos como conservantes conduce, en ciertas circunstancias, a la aparición un olor "a petróleo" o "gasolina". Este hecho se debe a la existencia de cepas de *Penicillium* spp. capaces de descarboxilar el ácido sórbico y transformarlo en 1,3-pentadieno, un compuesto típico de la gasolina y el queroseno. Otro ejemplo es el olor anormal a "ahumado/fenólico" que se detecta en algunas leches chocolateadas o vainilladas y que es fruto de la producción de guayacol por parte de microorganismos de los géneros *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhanella*, *Rhodotorula* y *Streptomyces.*

5. INDICADORES DE VIDA ÚTIL

La vida útil es un atributo importante de todos los alimentos; guarda relación con la calidad total del alimento y depende de los ingredientes, del sistema de producción, del transporte y del almacenamiento (incluyendo el que se realiza en los hogares). La vida útil puede determinarse mediante una combinación de análisis microbiológicos y químicos en muestras del alimento tomadas a lo largo de su vida de almacén, siguiendo diversas estrategias (Figura 3). Por ejemplo, las pruebas de almacenamiento, en las que se toman muestras a ciertos intervalos de tiempo y se determina su carga microbiana total y la de ciertos microorganismos alterantes, como *Pseudomonas*, *Brochothrix thermosphacta* o

Figura 3. *Indicadores de vida útil de un alimento. Adaptado de Forsythe (4).*



bacterias lácticas. Los recuentos de bacterias viables se comparan con la evaluación química y sensorial del producto, y se establecen correlaciones para identificar los indicadores clave de la alteración inicial de los alimentos. Además, cada vez tiene más relevancia la modelación predictiva, a pesar de que todavía la mayoría de los modelos predictivos tienen por objetivo a los microorganismos patógenos en vez de a los alterantes, que son los que más limitan la vida útil de cualquier producto alimenticio.

Diversos compuestos químicos se emplean como indicadores para determinar y predecir la vida útil de los alimentos. La mayoría son sustratos que emplean los microorganismos para crecer o bien metabolitos que se producen en la fase estacionaria del crecimiento microbiano (5). Entre ellos, destacan los siguientes (4):

(a) *Glucosa:* Representa el principal nutriente para los microorganismos en las carnes rojas, incluidas aquellas envasadas en atmósferas modificadas y a vacío. Tras su agotamiento, las *Pseudomonas* inician la utilización de los aminoácidos, lo que conduce a una rápida alteración.

(b) *Ácidos glucónico y 2-oxoglucónico:* Proceden del metabolismo de la glucosa por especies del género *Pseudomonas.*

(c) *Ácidos L-láctico, D-láctico, acético y etanol:* La producción de estas sustancias a partir de la glucosa podría ser un buen indicador de iniciación de la alteración de algunos alimentos, como la carne de cerdo o de vacuno.

(d) *Aminas biógenas o biológicamente activas:* Ciertas enterobacterias y bacterias lácticas producen aminas biógenas, como la tiramina o la histamina, en una amplia variedad de alimentos. Su producción no conlleva una alteración organoléptica manifiesta pero representa un riesgo para la salud debido, entre otras, a sus propiedades vasoactivas. Estas sustancias se tratarán en detalle posteriormente.

(e) *Compuestos volátiles:* La determinación de los compuestos volátiles resulta particularmente útil ya que no requiere el empleo de métodos de extracción a partir del alimento y permite la detección simultánea de productos derivados de la actividad microbiana y otros originados por reacciones químicas en las que no participan los microorganismos. Así, durante la alteración de la leche, se puede detectar 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, 2-propanol, etilhexanoato, etilbutanoato, 1-propanol, 2-metil propanol y 1-butanol. Por otra parte, se ha propuesto el empleo de la acetona, metil etilcetona, dimetil sulfuro y dimetil disulfuro como indicadores de alteración de la carne picada, de la acetoína y el diacetilo para el magro de cerdo y de la trimetilamina para el pescado.

6. ALTERACIONES DE DIVERSOS GRUPOS DE ALIMENTOS

A continuación, se analizará los procesos de alteración de diversos grupos de alimentos. Hay que señalar que no se pretende realizar una revisión exhaustiva ya que existen excelentes monografías (6, 7) sino simplemente presentar una serie de ejemplos que sirvan para ilustrar las relaciones entre los factores químicos y microbiológicos en los procesos alterativos o las existentes entre la alteración de los alimentos y la seguridad alimentaria.

6.1. Alteración de la carne

La carne es un buen sustrato para el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos ya que posee una elevada actividad de agua (0,99), es rica en proteínas, lípidos, diversos componentes solubles de bajo peso molecular, vitaminas y minerales y contiene una pequeña concentración de carbohidratos (0-1,2%). Además, la carne se puede contaminar fácilmente durante las operaciones de sacrificio, carnización, procesado y almacenamiento.

Durante la fase de rigor, cesa la respiración en las células musculares, que dejan de sintetizar ATP. Subsiguientemente, la glicolisis conduce a una acumulación de ácido láctico y, en consecuencia, descende el pH del tejido muscular. El pH final (5,5-5,8) y la concentración de glucógeno residual dependen del contenido inicial de glucógeno en el músculo. Inicialmente, los microorganismos crecen a expensas de los materiales de bajo peso molecular (glucosa, ribosa, glicerol, lactato, aminoácidos), algunos de los cuales resultan de la glicólisis anaerobia del glucógeno almacenado y de la hidrólisis del adenosintrifosfato (ATP) a inosinmonofosfato (IMP). Durante el almacenamiento de la carne, el IMP y la inosina continúan su degradación a hipoxantina, ribosa y ribosa fosfato, sustancias que sirven para el crecimiento de *Brochothrix thermosphacta*, bacterias lácticas y bacterias Gram-negativas. La proteolisis microbiana de las proteínas estructurales se produce en las últimas fases de la alteración.

La concentración de glucógeno muscular en los animales vivos es variable pero se agota rápidamente con el ayuno, el ejercicio y/o el estrés previo al sacrificio. Una baja concentración de glucógeno muscular resulta en una menor producción de ácido láctico y un valor de pH más elevado. Cuando el pH es mayor de 6, el oxígeno penetra menos en la carne y disminuye la concentración de oximioglobina visible por lo que la carne aparece más oscura de lo normal y se se suele denominar carne “oscura, firme y seca” (DFD, del inglés *Dark,*

Firm and Dry). Las carnes DFD son más corrientes en vacuno pero pueden aparecen en otras especies de abasto. La alteración de estas carnes es más rápida que la de las carnes con un pH normal debido a la ausencia de glucosa en los tejidos. En estas circunstancias, las bacterias (y, en particular, las *Pseudomonas*) tienen que recurrir a los aminoácidos como primera fuente de carbono y su degradación es la responsable de la aparición de características sensoriales repugnantes.

La carne de cerdos sometidos a estrés (y, en menor medida la de otras especies) puede sufrir una glicolisis acelerada que hace que el músculo alcance su pH final mientras su temperatura es todavía elevada. Cuando esto sucede, las carnes reciben el apelativo de "pálidas, blandas y exudativas" (PSE, del inglés *Pale, Soft and Exudative*), ya que son sus principales características. En contraste con las carnes DFD, las PSE suelen observar un patrón de alteración similar al de las carnes normales.

Los microorganismos psicrotrofos son los responsables de la alteración de las canales en condiciones de refrigeración (Tabla 3). Entre la microbiota alterativa destacan los bacilos aerobios Gram-negativos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (que representa más del 50% de la microbiota alterante, destacando las especies *P. fragi*, *P. lundensis* y *P. fluorescens*), *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas* y *Psychrobacter* (8) mientras que *B. thermosphacta* suele representar una proporción minoritaria. La velocidad de la alteración aumenta con: 1) la concentración inicial de psicrotrofos que contaminan la canal, 2) el aumento de la temperatura de almacenamiento y 3) el aumento de la actividad de agua de la superficie de la canal (que depende de la velocidad del aire y de la humedad relativa). La alteración se manifiesta por cambios en el olor, flavor y aspecto de la carne, incluyendo la aparición de colonias bacterianas visibles macroscópicamente. En las canales magras, los olores repugnantes se aprecian cuando la concentración bacteriana alcanza, aproximadamente, 10^7 unidades formadoras de colonia (ufc)/cm^2. La viscosidad aparece cuando la actividad de agua está próxima a 0,99 y el recuento se sitúa en torno a 10^8 ufc/cm^2. Cuando la superficie permanece seca pueden aparecer colonias de micrococos, levaduras y mohos. A temperatura ambiente, la microbiota alterante está constituida por bacterias mesófilas, predominantemente clostridios (*C. perfringens*), enterobacterias y *Acinetobacter*.

Durante el almacenamiento de la carne en refrigeración y en condiciones aerobias, la glucosa termina desapareciendo y entonces las bacterias deben recurrir al ácido láctico y a los aminoácidos como fuentes de carbono. La degradación de los aminoácidos resulta en la producción de una mezcla compleja de

ésteres, alcoholes, compuestos azufrados, amoniaco, aminas, hidrocarburos insaturados, cetonas y otros compuestos, lo que origina la aparición de características sensoriales repugnantes (Tabla 3). Las cepas de *P. fragi* son las mayores productoras de ésteres etílicos, responsables del olor afrutado dulce característico de la fase inicial de deterioro (8). Estas y otras cepas pertenecientes a otras especies de *Pseudomonas* también producen putrescina a partir de la arginina y una serie de compuestos azufrados responsables de los olores pútridos de la fase avanzada de alteración. *B. thermosphacta* origina ácidos y alcoholes de cadena ramificada, acetoína y diacetilo mientras que las enterobacterias (*Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*) contribuyen a la formación de compuestos azufrados y de cadaverina a partir de la lisina. El crecimiento fúngico aparece tras un almacenamiento prolongado (2) y suelen estar implicadas especies de los géneros *Mucor, Rhizopus* y *Thamnidium* ("florecido algodonoso"), *Cladosporium y Penicillium* (manchas negras amarillas y verdes) o *Sporotrichum* y *Chrysospoium* (manchas blancas).

En la carne envasada al vacío, la atmósfera que se genera inhibe el crecimiento de la flora aerobia Gram-negativa y favorece el predominio de ciertas bacterias lácticas, fundamentalmente de los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium* y *Leuconostoc* (Tabla 3). El crecimiento de otras especies, como *B. thermosphacta*, *Clostridium laramie* o *Shewanella putrefaciens*, depende del pH, de la permeabilidad de la película y de la temperatura. El desarrollo de estas bacterias da lugar a una amplia variedad de productos finales de su metabolismo (Tabla 3) y origina la pérdida de sus propiedades organolépticas. Por ejemplo, el ácido sulfhídrico formado reacciona con la oximioglobina para originar sulfohemoglobina, sustancia responsable del enverdecimiento de estos alimentos.

6.2. Alteración del pescado fresco

El número de especies de pescados explotadas habitualmente como alimento es mucho mayor que el de especies de mamíferos utilizados para producir carne. Este hecho se refleja en la enorme variabilidad en la composición del pescado dependiendo de la especie, la fase de desarrollo, el caladero, la estación, la alimentación y los métodos de captura (o cultivo en el caso de la acuicultura) y manipulación. La composición media de las especies magras, como el bacalao, suele ser de un 80% de agua, un 18% de proteína, un 1% de carbohidratos y menos de un 1% de lípidos. En contraste, el contenido lipídico de los pescados grasos, como la caballa, puede variar entre un 1 y un 30%. En general, los componentes solubles no proteicos constituyen aproximadamente un

TABLA 3. *Bacterias alterantes de la carne: sustratos utilizados para su crecimiento y principales metabolitos finales*

	Sustratos para el crecimiento[a]		**Principales metabolitos finales**	
Microorganismo	**Aerobiosis**	**Anaerobiosis**	**Aerobiosis**	**Anaerobiosis**
Pseudomonas	Glucosa[1] Aminoácidos[2] Ácido láctico[3]	—	Exopolisacáridos (limo), sulfuros, ésteres, aminoácidos	—
Acinetobacter/ Moraxella	Aminoácidos[1] Ácido láctico[2]	—	Ésteres, nitrilos, oximos, sulfuros	—
Shewanella	Glucosa[1] Aminoácidos[2] Ácido láctico[3]	Glucosa[1] Aminoácidos[2]	Sulfuros volátiles	H_2S
Brochothrix	Glucosa[1] Ribosa[2]	Glucosa	Ácido acético, acetoína, ácido isovalérico, ácido isobutírico	Ácido láctico, ácidos grasos volátiles
Enterobacter	Glucosa[1] Glucosa 6- fosfato[2] Aminoácidos[3] Ácido láctico	Glucosa[1] Glucosa 6- fosfato[2] Aminoácidos[3]	Sulfuros, aminas	H_2S, aminas
Bacterias lácticas	—	Glucosa Aminoácidos	—	Ácido láctico, ácidos grasos volátiles

[a] Los superíndices indican el orden de preferencia en la utilización de sustratos.

1,5% del músculo del pescado y entre ellos se incluyen azúcares, minerales, vitaminas, aminoácidos libres, amoniaco, óxido de trimetilamina, creatina, taurina, anserina, ácido úrico, betaina, carnosina e histamina. Los elasmobranquios (rayas, tiburones) contienen una concentración más elevada de estos compuestos y particularmente de urea (2%).

Los cambios alterativos empiezan tan pronto como el pez muere o, incluso, antes si ha gastado parte de sus reservas de energía durante la resistencia a la captura. Los principales agentes de alteración son las enzimas y las bacterias endógenas. Se observan dos fases solapadas en el proceso de deterioro: la autólisis, debida a la rotura del equilibrio de las funciones metabólicas del pez, y la fase bacteriana, donde se producen los efectos más evidentes (9).

La actividad celular continúa después de la muerte, impulsada por las reservas de energía (fundamentalmente glucógeno). La degradación del glucógeno en glucosa y ácido láctico es similar a la que se produce en la carne de los mamíferos excepto en la fase inicial, en la que se produce glucosa fundamentalmente por vía hidrolítica y no por reacciones fosforolíticas. Aunque la caída del pH es más rápida en los pescados que en los mamíferos, la mayor parte de los peces vivos tienen menos glucógeno en los músculos y gran parte del mismo se pierde durante la captura, de manera que el pH final es relativamente alto. Hay diferencias significativas entre las diferentes especies de pescado y dentro de una misma especie el pH del músculo puede variar considerablemente, dependiendo de la estación del año y del estado biológico. Se han observado valores de pH por debajo de 6,0 en algunas especies, como el fletán, la caballa y el atún pero en la mayor parte de los demás pescados suele estar entre 6 y 7. Cuando el pH desciende, las proteínas del músculo se acercan a su punto isoeléctrico y comienza la desnaturalización, con un descenso de la capacidad de retención de agua y la liberación de pequeñas cantidades de exudado (“goteo”). En los casos más extremos, la carne se vuelve opaca (“yesosa”) y adquiere una textura blanda.

La pérdida de las reservas de energía celular se traduce en un desequilibrio químico intracelular que activa ciertas enzimas endógenas proteolíticas, generando rupturas de los enlaces peptídicos que provocan el aflojamiento de la estructura muscular. En este momento termina el *rigor mortis* y es cuando el pescado presenta la mejor calidad para ser degustado. El sabor del pescado cocinado después del *rigor* difiere del cocinado antes o durante dicho proceso. En el caso de *pre-rigor,* el sabor es menos dulce pero suele tener una nota metálica y la textura suele ser más dura y algo “fibrosa”. Inmediatamente después del *rigor* la textura es firme pero fácil de masticar y el sabor cambia haciéndose clara-

mente dulce con notas características que dan a las diferentes especies sus sabores típicos y reconocibles. Sin embargo, aunque el pescado *post-rigor* es más gustoso, hay también una pérdida de frescura ya que la actividad continuada de las enzimas endógenas ha provocado la degradación casi total de ATP, vía adenosina difosfato (ADP), a adenosina monofosfato (AMP), seguida de una rápida desaminación a inosina monofosfato (IMP). El dulzor del pescado fresco cocinado se debe principalmente a la presencia de azúcares, como la glucosa, la fructosa y sus fosfatos. El dulzor adicional y gran parte de los sabores característicos de las diversas especies procede del sinergismo entre el IMP y los aminoácidos libres. El IMP también hace su propia contribución al flavor.

A partir de este punto de máxima suculencia, se produce un descenso gradual del aspecto, olor, textura y sabor del pescado causado por la acción enzimática continuada. Los ojos se aplanan y la piel pierde la impresión visible de los paquetes musculares subyacentes, aunque la carne pueda mantenerse todavía suficientemente firme. La limosidad se hace más visible al perder su transparencia y desarrollar un tono lechoso diluido. El color de las agallas se marchita, los cambios en las concentraciones de alcoholes y de compuestos carbonilo provocan cambios en el aroma y la intensidad del flavor se reduce al disminuir la concentración de IMP.

Los cambios hasta ahora descritos, debidos casi exclusivamente a la actividad de las enzimas endógenas, son considerables en términos químicos y establecen la diferencia entre un producto muy atractivo y otro que, como mucho, puede calificarse de insípido. Una de las consecuencias más dramáticas de la actividad autolítica de las enzimas que puede producirse en el pescado no eviscerado, especialmente en las especies de pescados pelágicos pequeños que se han alimentado abundantemente antes de ser capturadas y almacenadas con poco o ningún hielo, es lo que se conoce como “reventón o explosión de tripa”.

Solapándose con los fenómenos de autolisis, tiene lugar el deterioro de origen microbiano. La microbiota bacteriana de los pescados de aguas frías de las regiones árticas y templadas consiste fundamentalmente en psicrófilos aerobios Gram-negativos. La mayor parte de la flora externa del pescado consiste en microorganismos de dos grupos genéricos principales: *Pseudomonas-Alteromonas-Shewanella* y *Moraxella-Acinetobacter*. Otros aerobios encontrados en la carne fresca del pescado incluyen miembros de géneros *Vibrio, Flavobacterium* y *Cytophaga,* y también algunos Gram-positivos, como *Micrococcus* y *Corynebacterium*. También suele haber un pequeño número de anaerobios obligados como *Clostridium* spp. Entre estas bacterias las más corrientemente implicadas en la alteración son especies de los géneros *Shewanella* y *Pseudomonas*, sien-

do *Shewanella putrefaciens* la que predomina a bajas temperaturas (10). Las bacterias Gram negativas predominan en el pescado descompuesto a temperaturas relativamente elevadas (10-37 °C) y, en tales condiciones, destacan *Aeromonas* (en especial *Aeromonas hydrophila*) y *Vibrio* (11). La alteración del bacalao envasado se ha atribuido a *Photobacterium phosphoreum* que produce unas treinta veces más trimetilamina que *S. putrefaciens* (12).

Los olores y flavores más propios de la alteración son, en esencia, el resultado de la utilización bacteriana de moléculas relativamente pequeñas e hidrosolubles de los tejidos del pescado, en especial los constituyentes de nitrógeno no proteico de los tejidos del pescado: aminoácidos, péptidos pequeños y, en los pescados marinos, óxido de trimetilamina (TMAO). Al progresar la alteración, el pH del músculo aumenta y permite que se liberen cantidades cada vez mayores de amoníaco que contribuyen a crear el típico olor del pescado descompuesto. Sin embargo, la causa predominante del olor amoniacal es la trimetilamina (TMA), que se produce por degradación del TMAO. Se piensa que tiene una función osmorreguladora dado que el TMAO va desapareciendo del músculo de los salmónidos según avanzan desde el mar a los ríos para desovar. La mayor parte de los pescados de agua dulce contienen poco o ningún TMAO pero existen excepciones como el lucio. Las cantidades de TMAO de los pescados marinos varían mucho, desde cerca de 100 a más de 1.000 mg por cada 100 g. Otros productos del metabolismo bacteriano que contribuyen significativamente a la percepción sensorial de la alteración son los ácidos de cadena corta (láctico, butírico), los aldehídos y cetonas procedentes de los lípidos titulares, los sulfuros volátiles (sulfuro de hidrógeno, sulfuro de dimetilo, mercaptano de metilo) que derivan de los aminoácidos que contienen azufre (cisteína, metionina), las aminas (indol, escatol, histamina, putrescina, cadaverina) así como el amoníaco procedente de los aminoácidos y, más tarde, de las proteínas. La producción de proteinasas bacterianas está reprimida al principio pero se acelera en las últimas fases alterativas.

El factor principal del control de la alteración microbiana del pescado crudo es la temperatura (10). En general, cuando el pescado de las regiones templadas se mantiene a unos 0 °C hay una fase de latencia de 1 a 5 días, un crecimiento logarítmico de 6 a 14 días y una fase estacionaria después. Bajo la mayoría de las condiciones comerciales, la vida organoléptica inicia un rápido deterioro de la calidad a partir de los 12 días. Esto corresponde a la acumulación de los productos metabólicos bacterianos que varía de unas especies de pescado a otras.

La contaminación del pescado durante su manipulación y estiba a bordo afecta al deterioro (13). Esto es especialmente importante en los pescados que

tienen niveles altos de histidina libre endógena, como el atún o la caballa, ya que puede dar lugar a concentraciones peligrosas de histamina (véase más adelante). Cuando las temperaturas ambientales son altas los retrasos en la refrigeración acortan significativamente la vida útil durante el subsiguiente almacenamiento en refrigeración (11). Durante las operaciones de captura el pescado contacta con las redes, cuerdas, puente del barco y manos y ropas de los pescadores. Este contacto continúa durante las operaciones de estiba en las bodegas. No debe sorprender, por lo tanto, que el pescado fresco, excesivamente manipulado de las aguas templadas o frías, lleve un número elevado de bacterias Gram-positivas, entre las que se incluyen especies de los géneros *Corynebacterium*, *Micrococcus, Bacillus* y *Staphylococcus.* La contaminación microbiana del pescado también tiene lugar durante las operaciones de descarga de los barcos, las subastas públicas y la venta. Estibadores, subastadores, vendedores, compradores y espectadores pasean entre y alrededor de los recipientes del pescado al que aportan otros microorganismos. Aves, roedores, insectos y otros animales pueden tener acceso al pescado y contaminarlo. El ambiente del mercado de pescado contribuye a la incidencia de bacterias descarboxilantes de la histidina (14).

Durante el procesamiento del pescado, la contaminación más corriente procede de su manipulación directa (coliformes, estafilococos), de la transferencia directa de bacterias intestinales, de las agallas o de la piel a las superficies de los filetes y del paso al pescado de las bacterias del entorno (superficies contaminadas, cuchillos, máquinas, etc.). Este hecho puede acelerar el deterioro del pescado y/o implicar problemas para la seguridad del consumidor.

6.3. Alteración microbiana de la leche y productos lácteos

La leche es un excelente medio para el crecimiento de muchos microorganismos debido a su elevado contenido en agua, su pH cercano a la neutralidad y la variedad de nutrientes disponibles. Algunos microorganismos no pueden utilizar la lactosa por lo que dependen de los procesos de proteolisis o lipólisis para su crecimiento. Los productos lácteos representan ambientes sustancialmente distintos ya que algunos componentes de la leche pueden haber desaparecido mientras que otros pueden estar más concentrados; además sus valores de pH o actividad de agua pueden ser mucho menores que los de la leche.

La conservación de la leche cruda depende de unas buenas condiciones higiénicas y de que las operaciones de refrigeración inicial, pasteurización, enva-

sado y refrigeración de la leche pasteurizada se realicen adecuadamente. Las bacterias psicrotrofas que alteran la leche cruda y la pasteurizada pertenecen mayoritariamente a la Familia *Pseudomonadaceae* y, en menor medida, a miembros de la Familia *Neisseriaceae* y a los géneros *Flavobacterium* y *Alcaligenes* (Tabla 4). Las especies más asociadas con defectos en el flavor son *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas lundensis*. Son incapaces de utilizar la lactosa por lo que tales defectos son el resultado de

Tabla 4. *Principales defectos que se producen en la leche y los quesos como consecuencia del crecimiento microbiano*

Defecto	Microorganismos	Enzimas	Metabolitos
A. Leche			
Flavor amargo	Bacterias psicrótrofas, *Bacillus* spp.	Proteasas, peptidasas	Péptidos amargos
Flavor rancio	Bacterias psicrótrofas	Lipasas	Ácidos grasos libres
Flavor afrutado	Bacterias psicrótrofas	Esterasas	Ésteres de etilo
Coagulación	*Bacillus* spp.	Proteasas	Desestabilización de las caseínas
Flavor ácido	Bacterias lácticas	Enzimas glicolíticos	Ácido láctico, ácido acético
Flavor malteado	Bacterias lácticas	Oxidasas	3-metil-butanal
Textura viscosa	Bacterias lácticas	Polimerasas	Exopolisacáridos
B. Quesos			
Fisuras	Lactobacilos heterofermentativos		Dióxido de carbono
Gas temprano	Coliformes, levaduras		Dióxido de carbono, hidrógeno
Gas tardío	*Clostridium* spp.		Dióxido de carbono, hidrógeno
Rancidez	Bacterias psicrótrofas		Ácidos grasos libres
Afrutamiento	Bacterias lácticas		Ésteres de etilo
Depósitos blanquecinos	*Lactobacillus* spp.		Excesivo D-lactato
Descoloración rosa	*Lactobacillus* spp.		Alto potencial redox

la producción de proteasas (flavores amargos y pútridos; coagulación), lipasas (rancidez, flavores afrutados), fosfolipasa y otras enzimas hidrolíticas.

Las proteasas formadas en la leche cruda representan una de las principales causas de alteración (amargor, formación de precipitados, coagulación) de la leche UHT (comercialmente estéril). Este tipo de leche es más sensible que la cruda a los defectos inducidos por las proteasas, seguramente por los cambios que el tratamiento térmico provoca en la estructura micelar de las caseínas y/o por la inactivación de los inhibidores de las proteasas. El efecto de las proteasas producidas por las bacterias psicotrofas sobre la calidad del queso y otros productos lácteos fermentados es mínima ya que la combinación de bajo pH y baja temperatura inhibe su actividad y, además, la mayor parte de las proteasas se eliminan con el suero. Sin embargo, el crecimiento de bacterias proteolíticas en la leche cruda disminuye el rendimiento quesero ya que los productos de la degradación de las caseinas se pierden con el suero en vez de incorporarse al queso.

Por lo que respecta a las lipasas bacterianas, su actividad suele afectar la leche y productos lácteos con una vida útil larga y/o que se almacenan a una temperatura elevada, como la leche UHT, algunos quesos, mantequilla y leche entera en polvo. El flavor a rancio se debe normalmente a la liberación de ácidos grasos de la serie C_4-C_8. Los ácidos grasos de tamaño mayor producen un flavor "jabonoso". *P. fragi* origina un flavor afrutado debido a la esterificación de ácidos grasos libres con etanol; los ésteres mayoritarios suelen ser el etil butirato y el etil hexanoato. Los quesos son más susceptibles a los defectos causados por lipasas que a los provocados por las proteasas ya que las primeras se concentran, junto con la grasa, en la cuajada. La acidez de muchos quesos limita (aunque no inactiva) la actividad lipásica. Por este motivo, aquellos quesos cuyo pH aumenta hasta casi la neutralidad durante su maduración (Camembert, Brie…) son más proclives a este tipo de defectos.

La alteración de la leche y productos lácteos por el crecimiento de bacterias lácticas de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* o *Enterococcus* tiene lugar cuando las temperaturas de almacenamiento son lo suficientemente altas como para que se impongan sobre las psicrotrofas o cuando la composición del producto inhibe el crecimiento de las bacterias Gram-negativas aerobias citadas anteriormente (Tabla 4). Así, la presencia de ácido láctico en leche es un buen indicador de que este fluido se expuso a temperaturas de almacenamiento inaceptablemente elevadas ya que permitieron el crecimiento de bacterias lácticas. La acidificación de la leche por bacterias lácticas produce un olor y sabor desagradables, que derivan fundamentalmente de las pequeñas cantidades de ácido acético y propiónico formadas más

que del ácido láctico, que es el metabolito mayoritario. Otros defectos que pueden aparecer son el flavor "malteado", debido al crecimiento de ciertas cepas de *Lactococcus lactis* capaces de producir 3-metil-butanal, 2-metil-butanal y los correspondientes alcoholes, y la aparición de viscosidad, debido a la producción de exopolisacáridos. Algunos coliformes, fundamentalmente de los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella*, también pueden alterar la leche pero se trata de un problema raro debido al predominio de bacterias psicrotrofas a temperaturas de refrigeración o de bacterias lácticas a temperaturas más elevadas.

Diversas bacterias lácticas pueden provocar defectos en el aspecto y flavor de los quesos por diversos mecanismos (Tabla 4). En el caso de algunos lactobacilos heterofermentativos (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*…) se debe a la producción de gas y diversos metabolitos durante la maduración. El crecimiento de ciertas cepas de *Lactobacillus delbrueckii* (que no pueden reducir el potencial redox del queso) o propionibacterias (que producen pigmentos) puede aparejar la aparición de una coloración rosacea. Finalmente, algunos lactococos producen esterasas y dan lugar a flavores afrutados.

La leche recién obtenida suele contener bacterias Gram-positivas formadoras de esporas, predominantemente del género *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. circulans*) y, en menor medida, del género *Clostridium*. La germinación de esporas tras la pasterización conduce a la coagulación dulce, ya que la actividad de una proteasa similar a la quimosina hace que la leche se corte sin generar de gas y sin desarrollar un flavor anómalo. Este mismo defecto se puede observar en la leche condensada. Eventualmente, la enzima degrada la caseína suficientemente como para producir un sabor amargo. Por lo que respecta a los quesos, el mayor defecto causado por estas bacterias es la formación de gas, normalmente por crecimiento de *Clostridium tyrobutyricum* y, ocasionalmente, de *Clostridium butyricum* o *Clostridium sporogenes* (Tabla 4). Este defecto, que altera tanto el aspecto como el flavor, se conoce como "hinchamiento tardío" ya que se presenta cuando el queso lleva varias semanas de maduración y afecta más a quesos con elevada humedad y pH y bajas concentraciones de sal en su interior (Emmental, Swiss, Gouda, Edam…). El hinchamiento tardío implica la fermentación del ácido láctico y la subsiguiente formación de ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno.

Finalmente, el crecimiento de mohos (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Hormodendrum*…) y levaduras (*Kluyveromyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Torulospora*, *Pichia*) es una causa común de alteración de los productos lácteos fermentados debido

a su capacidad para crecer en ambientes acídicos. Se manifiesta por la aparición de olores anómalos y la formación de gas.

6.4. Alteración microbiana de los cereales

Los carbohidratos de los cereales constituyen la mayor fuente de energía de que disponen los seres humanos; además, estos alimentos contienen cantidades significativas de proteínas, lípidos, minerales y vitaminas, especialmente de los grupos B, D y E. Todo ello, unido a su pH cercano a la neutralidad, hace que sean alimentos muy propicios para el crecimiento microbiano, que se previene desecándolos hasta que alcanzan una actividad de agua inferior a 0,7.

Todos los cereales están expuestos a una gran variedad de microorganismos, que pueden proceder del suelo, agua, fertilizantes, plantas enfermas o animales mientras están en el campo o del polvo, contenedores, cintas, sacos, depósitos, manipuladores o vectores durante su transporte y almacenamiento. Los principales microorganismos que hay que considerar en estos productos son los mohos y las bacterias esporuladas. Los primeros causan los principales problemas asociados a la producción de cereales. Los mohos "del campo", presentes en los granos al recolectarlos, suelen ser específicos de cada especie, al contrario que los mohos "de almacenamiento". En cualquier caso, pueden provocar manchas, escoriaciones, decoloraciones o apelmazamientos, reduciendo su calidad. Los granos muy infectados desprenden un olor "a moho" muy característico. Algunos mohos provocan la pérdida de calidad del gluten en las harinas y en las masas que se hagan con ellas. Los granos mohosos tienen una escasa capacidad de germinación y bajas propiedades de malteado por lo que igualmente son inaceptables para la elaboración de bebidas alcohólicas. En general, también pueden reducir considerablemente su valor nutritivo. Si el crecimiento fúngico no se controla adecuadamente, la temperatura de los granos puede elevarse hasta valores que provoquen la pérdida de la capacidad de germinación, decoloraciones masivas e incluso su combustión espontánea.

El crecimento de los mohos lleva aparejado ciertos cambios químicos que colaboran en los procesos alterativos de los granos. Así, puede haber un aumento del índice de acidez como consecuencia de la actividad de las lipasas de los mohos sobre los triglicéridos. De hecho, el índice de acidez se emplea como medida de la actividad fúngica. La cantidad de dióxido de carbono que se libera a la atmósfera y la pérdida de materia seca también se relacionan bien con la concentración de mohos contaminantes. Además, la alteración del flavor y el

aroma es debida, en parte, a la producción de compuestos aromáticos volátiles, entre los que destacan el 3-metil-butanol, 3-octanona, 3-octanol y 1-octanol.

Por otra parte, muchos de los hongos que contaminan a los cereales son micotoxigénicos (Tabla 5) y representan un grave problema mundial para el abastecimiento de cereales y derivados ya que, una vez formadas, no se pueden controlar con las técnicas habituales de manipulación post-cosecha y de almacenamiento. Una vez más, se establece una asociación entre alteración y seguridad alimentaria.

Las bacterias que se encuentran en los granos pertenecen fundamentalmente a las familias *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae*, *Lactobacillaceae* y *Bacillaceae*. Las bacterias esporuladas forman parte de la microbiota característica de los cereales y, algunas de ellas, como *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*, pueden sobrevivir a la cocción. De hecho, esta última especie es la más importante como causa de intoxicaciones alimentarias asociadas al consumo de arroz cocido. Los granos y harinas pueden actuar como portadores de bacterias patógenas, como *Salmonella* spp., cuando se contaminan a partir de vectores, manipuladores, utensilios, etc. Estas bacterias no suelen crecer en condiciones de baja actividad de agua pero si las harinas contaminadas se emplean para la elaboración de un alimento húmedo, entonces se puede producir una toxiinfección. En general, los problemas alterativos son infrecuentes en las masas refrigeradas. Sin embargo, si las condiciones de almacenamiento son inadecuadas puede haber un crecimiento de bacterias lácticas (especialmente del género *Leuconostoc*) y levaduras, que pueden originar diversos problemas, desde viscosidad a cambios indeseables en la textura aroma o flavor.

Tabla 5. *Principales mohos toxigénicos que contaminan los cereales*

Cereal	Mohos	Micotoxinas
Maíz	*Fusarium moniliforme* *Aspergillus flavus*	Fumonisinas, fusarinas Aflatoxinas
Trigo	*Fusarium graminearum* *Alternaria alternata*	Deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona Ácido tenuazónico
Centeno	*Fusarium poae* *Fusarium sporotrichioides*	T-2 T-2
Sorgo	*Alternaria alternata*	Ácido tenuazónico
Cebada	*Penicillium verrucosum*	Ocratoxina A

7. LA ALTERACIÓN COMO INDICADORA DE LA PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Los alimentos se contaminan frecuentemente con microorganismos potencialmente patógenos y, sin embargo, las tasas de toxiinfecciones alimentarias son relativamente bajas en los países desarrollados. Este hecho se debe a dos factores: 1) el estado de salud de los hospedadores y 2) el rechazo a la ingestión de alimentos alterados. Muchos microorganismos saprofitos se multiplican más rápidamente que los patógenos cuando se encuentran en los alimentos y, además, suelen tener un metabolismo más activo en este tipo de sustratos. De este modo, se produce una serie de metabolitos que alteran las características organolépticas del alimento antes de que los patógenos hayan alcanzado una dosis infecciosa. En consecuencia, el consumidor rechazará ese alimento. Paradójicamente, se considera que cuanto menor es la concentración de los microorganismos alterantes activos, mayor es el riesgo de que pase desapercibida la contaminación con patógenos (15). Por ejemplo, se ha observado que la conservación de los espárragos en atmósferas modificadas restringe el crecimiento de los alterantes y aumenta su vida útil; de esta manera, se permite que *Listeria monocytogenes* alcance una concetración mucho mayor que la que tendría tras un almacenamiento aerobio tradicional (16).

Obviamente, la alteración de los alimentos es una señal "imperfecta" ya que en algunas ocasiones, los patógenos pueden alcanzar concentraciones clínicamente relevantes antes en los alimentos antes de que éstos muestren signos de alteración. Por ejemplo, en el caso de alimentos tratados térmicamente y que sufren una recontaminación posterior por un patógeno. El tratamiento o procesado de los alimentos destruye o reduce al mínimo la concentración de microorganismos contaminantes en los alimentos preparados. En este contexto, un contaminante fortuito, como *Staphylococcus aureus* o *Salmonella* spp., ni tendrá la competencia de los alterantes ni producirá cambios organolépticos que revelen su presencia. En consecuencia, es necesario seguir unos estrictos procedimientos de higiene para evitar la recontaminación de los alimentos procesados.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que la dosis infectiva no es la misma para todas las personas, existiendo grupos de población para los que una concentración baja de ciertas especies, como *Listeria monocytogenes*, puede desarrollar una enfermedad grave e incluso mortal. Por este motivo, la primera prioridad de un estudio de caducidad es garantizar la seguridad del alimento evaluado (6) sobre la base de la correcta implantación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC), en el que se tenga en cuenta la

población diana a la que va destinada el alimento en cuestión. Los grupos de consumidores de riesgo incluyen a los niños menores de 5 años, las mujeres embarazadas, las personas mayores de 65 años y las personas inmunodeprimidas.

Finalmente, algunos tipos de alteraciones pueden incluso suponer un aumento de los riesgos microbiológicos al crear un microambiente favorable para el crecimiento de patógenos. En este sentido, se ha observado que *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* crece mejor en tomates, patatas y cebollas en presencia de mohos alterativos de los géneros *Botrytis* o *Rhizopus* que cuando éstos están ausentes (17).

8. EFECTOS NEGATIVOS DE LA ALTERACIÓN ALIMENTARIA EN LA SALUD DE LOS CONSUMIDORES

Tradicionalmente, se ha considerado que los alimentos deteriorados tenían unas propiedades organolépticas indeseables para los consumidores pero no comprometían su salud. Actualmente, se sabe que numerosos compuestos originados durante distintos procesos alterativos son potencialmente perjudiciales para la salud tras una exposición más o menos prolongada. Por ejemplo, los lípidos del pescado correctamente conservado son importantes desde el punto de vista nutricional pero su oxidación conlleva efectos negativos sobre diversos procesos fisiológicos. Sin embargo, la principal consecuencia del consumo del pescado que ha perdido las atractivas propiedades del producto fresco puede ser el rechazo por parte de los consumidores de una parte muy valiosa de una dieta variada.

Dado que la simple enumeración de las reacciones alterativas, sustancias resultantes y posibles efectos asociados resultaría demasiado extensa, se tomarán como ejemplo dos grupos de compuestos que se pueden presentar en un amplio espectro de alimentos. En primer lugar, los productos derivados de la reacción de Maillard (PRM), procedentes de un proceso alterativo que, en general, no depende de la presencia de microorganismos; en segundo lugar, las aminas biógenas derivadas del metabolismo de ciertos microorganismos.

8.1. Reacción de Maillard

La gran complejidad química que entraña la reacción de Maillard, así como la frecuencia con la que se produce en los alimentos, ha suscitado un enorme

interés. Esta reacción es especialmente importante para la industria alimentaria, ya que se da frecuentemente en los alimentos durante procesos como el horneado, tostado, fritura, etc. La reacción les confiere nuevos colores, olores, sabores y texturas que pueden ser agradables para el consumidor pero, al mismo tiempo, puede originar sustancias que los alteren o que sean peligrosos para la salud. Además la reacción de Maillard puede disminuir el valor nutritivo de los alimentos aunque las consecuencias nutricionales de la reacción no están estandarizadas debido a que varían en función de una serie de parámetros como, por ejemplo, la estructura química de los reactantes, sus concentraciones, la temperatura, el pH, la presión, el tiempo y la actividad de agua (18).

La reacción de Maillard puede dividirse en tres etapas (Figura 4):

1) *Etapa temprana:* esta etapa corresponde a una serie de reacciones químicas, conocidas y caracterizadas, en las que aún no se produce pardeamiento. Comienza con la condensación entre el grupo carbonilo del azúcar reductor o un lípido oxidado y el grupo amino de un aminoácido, péptido o proteína, originando la base de Schiff, que sufre una reorganización llamada de Amadori. Esto origina ya una pérdida de valor nutritivo, porque el grupo amino queda bloqueado y no es disponible. El producto que se obtiene se llama compuesto de Amadori (N-sustituido-l-amino-1-deoxi-2-cetosa) y se ha detectado en alimentos calentados, liofilizados y almacenados (19).

2) *Etapa avanzada:* en condiciones de temperatura más extremas se forman gran cantidad de compuestos que son los responsables de los olores que desprenden los alimentos cocinados. En esta etapa se produce la fragmentación de los azúcares y la degradación de los aminoácidos, formándose compuestos coloreados y fluorescentes. El pH influye decisivamente en el desarrollo de la reacción, de manera que pueden seguirse tres rutas diferentes a partir del compuesto de Amadori: 1) Pérdida de moléculas de carbono por escisión que da lugar a la formación de compuestos que pueden contener nitrógeno y reaccionar con otros productos intermedios de la reacción, responsables de los aromas característicos. 2) Deshidratación dando reductonas y dihidrorreductonas que pueden reaccionar con aminoácidos que sufren la denominada degradación de Strecker dando lugar a piracinas y aldehídos componentes del olor y sabor de los alimentos cocinados (20). El compuesto de Amadori puede degradarse y originar precursores de los PRM (21). En concreto la hidroxiacetona es un precursor de la piracina mientras que el gliceraldehído y el metilglioxal son más propensos a participar en los

mecanismos de pardeamiento. 3) Deshidratación fuerte que produce furfural y derivados responsables del aroma.

3) *Etapa final:* incluye una serie de reacciones de condensación, originando oligómeros y polímeros insolubles de elevado peso molecular. Se trata de pigmentos pardos llamados melanoidinas, difíciles de aislar y cuya estructura y caracterización todavía son objeto de estudio.

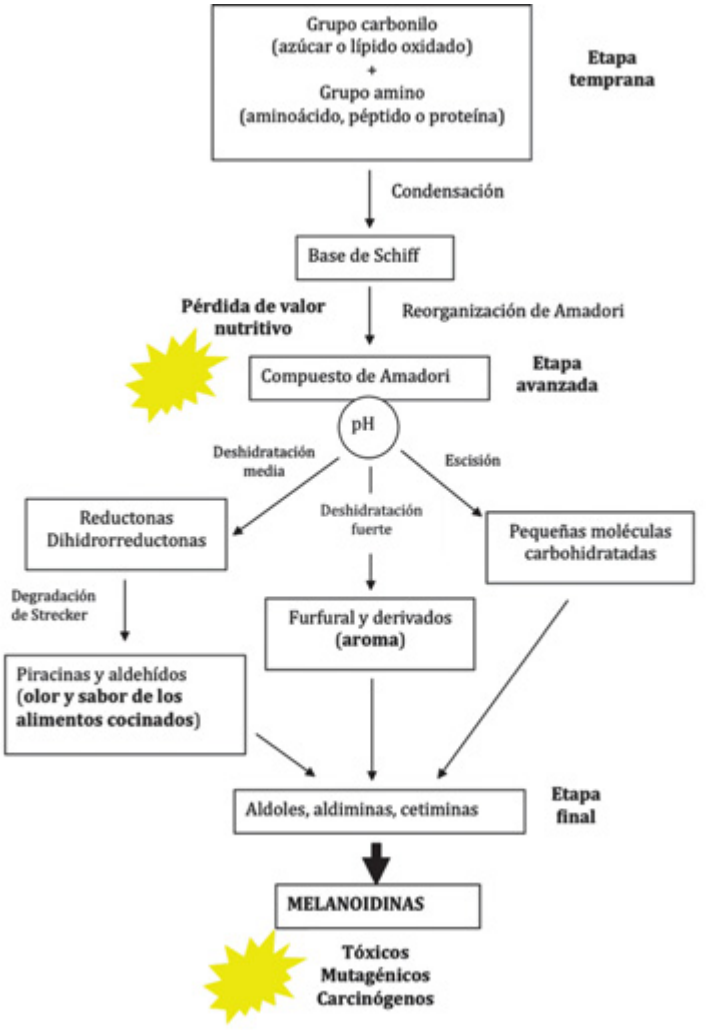


Figura 4. *Esquema básico de la reacción de Maillard*

8.1.1. Efectos en la ingesta

Algunos estudios *in vivo* han mostrado que la presencia de PRM en la dieta afecta negativamente a la ingesta y al peso, produciendo su disminución con respecto a los que no los consumen. En ratas, la disminución en la ingesta alimentaria aumenta paralelamente al incremento del calentamiento y, en consecuencia, del pardeamiento (22). Otros autores también han observado una disminución de peso en ratas alimentadas con fórmulas infantiles líquidas esterilizadas con respecto a las que consumieron las fórmulas en polvo. Esto puede deberse a que durante la esterilización de la leche, la lactosa se hidroliza dando lugar a la formación de un azúcar denominado lactulosa (23), que puede modificar el f1avor y el olor de la leche haciéndola menos aceptable.

8.1.2. Efectos en las proteínas y aminoácidos

Una de las consecuencias más importantes de la reacción de Maillard es la degradación de las proteínas producida durante el calentamiento de los alimentos, ya que supone la interacción de grupos amino terminales con grupos carbonilo asociados a azúcares reductores o lípidos oxidados, produciéndose, por tanto, el bloqueo del aminoácido. La disminución en la calidad nutritiva de la proteína se produce debido a: a) la reducción de la disponibilidad de aminoácidos, ya que éstos pueden quedar retenidos por muchos compuestos derivados de la descomposición de los productos de Amadori impidiendo su absorción (24); b) la inhibición de la actividad de determinadas enzimas implicadas en su digestión, y/o c) por la reducción de la digestibilidad de la proteína debido a cambios estructurales de la misma (25).

Aminoácidos como la metionina, el triptófano, la arginina o la histidina pueden afectarse durante el tratamiento térmico de los alimentos pero el aminoácido más sensible es la lisina, debido a la reactividad de su grupo e-amino incluso cuando forma parte de una cadena peptídica (26). Aun cuando el calor aplicado no sea excesivo, la pérdida de lisina disponible puede traducirse en una disminución del valor biológico. Sin embargo, cuando la intensidad del tratamiento térmico es máxima, la reducción de la calidad de la proteína puede ser mayor que la consecuente a la pérdida aparente de lisina disponible. Estudios en alimentos como la leche y sus derivados con un elevado contenido en lisina, indican que cuando este aminoácido reacciona con el grupo carbonilo de la lactosa, queda bloqueado y, por tanto, no es biodisponible, de manera que el valor nutricional de este alimento desciende considerablemente. Rerat *et al*., (24) eva-

luaron las consecuencias de la ingesta de leche con un alto contenido en lactulosil-lisina en la dieta de los cerdos, pudiendo comprobar que la lisina unida a la lactosa no era biodisponible y que la pérdida del valor nutritivo de la proteína era proporcional al deterioro de la lisina durante el calentamiento de la leche y, en menor grado, a la disminución de su digestibilidad. La disponibilidad de la lisina también puede afectarse durante el tratamiento térmico de otros alimentos como el pan, las galletas, las pastas, fórmulas infantiles, etc. (24, 26). No obstante, el grado de reducción del valor nutricional de la proteína depende de muchos factores comentados anteriormente, tales como la naturaleza de los azúcares y proteínas, temperatura, tiempo, actividad de agua, etc. (27).

Existen numerosos estudios *in vivo* encaminados a dilucidar los posibles mecanismos implicados en la disminución de la digestibilidad de la proteína (24). Las melanoidinas procedentes del sistema modelo glucosa-glicina pueden modificar la absorción de algunos aminoácidos y reducir la digestibilidad de la proteína mientras que, otras veces, ésta reducción puede deberse a la inhibición de determinadas enzimas implicadas en su digestión, como las enzimas pancreáticas o las enzimas proteolíticas intestinales como la aminopeptidasa N (28). Estudios recientes realizados en humanos manifiestan que la ingesta de dietas ricas en PRM afecta negativamente la digestibilidad de la proteína, y tiende a mermar la utilización global del nitrógeno de la dieta (29).

8.1.3. Efectos en los carbohidratos

El desarrollo de la reacción de Maillard produce también el bloqueo progresivo de los azúcares presentes en los alimentos y además afecta a las enzimas intestinales implicadas en su digestión. Los PRM de bajo peso molecular, procedentes de mezclas calentadas de glucosa-lisina, inhiben débilmente la actividad de enzimas como la lactasa, invertasa, maltasa y trealasa, mientras que los PRM de elevado peso molecular se comportan como potentes inhibidores de esas disacaridasas, siendo las más afectadas la sacarasa y lactasa. La inhibición de la actividad de estas enzimas por parte de los PRM, con la consecuente disminución en la absorción de los hidratos de carbono, puede causar diarrea y un descenso en el peso de ratas alimentadas con dietas ricas en PRM, debido posiblemente a un efecto osmótico de los carbohidratos no absorbidos en el intestino. Estos efectos varían en función de la naturaleza de los productos de la reacción y son más pronunciados cuanto mayor sea su grado de pardeamiento. Además, se ha observado que en la elaboración y almacenamiento de fórmulas enterales se producen cambios en la composición de los carbohidratos, con la

consiguiente disminución de la biodisponibilidad de nutrientes esenciales para el organismo (30, 31).

8.1.4. Efectos en las vitaminas

Se ha observado que durante el calentamiento de alimentos como la leche, en la que se forman PRM, se produce un aumento en la pérdida de vitaminas, como es el caso de algunas del grupo B y el ácido pantoténico mientras que otras como el ácido nicotínico y la biotina apenas se ven afectadas. La destrucción de vitaminas también se ha estudiado en alimentos, como la leche en polvo, almacenados a elevadas temperaturas en la que se observaron pequeñas pérdidas de tiamina, vitamina B6 y B12, descensos que aumentaron con el avance del pardeamiento (32). De igual modo, determinados procesos utilizados en la tecnología alimentaria como la extrusión, en la que llegan a aplicarse temperaturas superiores a 200 ºC, favorecen el desarrollo de la reacción de Maillard generando productos que pueden reducir la biodisponibilidad de las vitaminas (33). Las vitaminas A, E, C, los tocoferoles y el β-caroteno pueden degradarse durante la aplicación de un calor excesivo en el proceso de extrusión (34).

8.1.5. Efectos en los minerales

Numerosos autores han sugerido que la capacidad quelante de los PRM se debe a que estos compuestos se comportan como polímeros aniónicos capaces de formar complejos con ciertos iones metálicos pudiendo alterar el proceso de absorción o afectar su normal metabolismo y excreción y reduciendo, en definitiva, su biodisponibilidad.

Las dietas que contienen PRM producen un aumento en la excreción urinaria de cobre, hierro y zinc, tanto en animales de experimentación como en humanos (35). Estudios en alimentos como el tomate, indican que determinados productos de Amadori como la D-fructosa-L-histidina, se comportan como potentes quelanles de cobre a pH fisiológico, capaces de formar complejos más estables que otros ligandos de reconocida actividad quelante y antioxidante como la L-histidina y la L-carnosina (36). Además, se ha observado que tanto las melanoidinas solubles como las insolubles, obtenidas tras el calentamiento de diferentes sistemas modelo aminoácido-azúcar, son capaces de quelar calcio y magnesio. El calcio puede ser quelado débilmente por los productos pardos pre-

sentes en el pan tostado. La adición de lactosa al pan y su posterior tostado incrementa la afinidad de estos PRM por el calcio, llegando a afectar significativamente su solubilidad (37). El hierro es uno de los minerales más sensible a la presencia de los PRM, tanto de bajo como de elevado peso molecular. La progresiva disminución de la solubilidad de hierro en relación con el calentamiento se debe a una disminución de la lisina libre y a la formación de melanoidinas insolubles (38).

8.1.6. Efectos mutagénicos y carcinogénicos

Dada la escasa información disponible sobre la relación entre estructura-efecto de los PRM de la dieta tanto en el propio alimento como en el organismo humano, se han fomentado diversas acciones europeas (COST 919: "Melanoidins in Food and Health" y COST 927: "Thermally Processed Foods: Possible Health Implications"), cuyo objetivo principal es el de investigar los métodos para obtener alimentos procesados más saludables y conocer más ampliamente los riesgos y beneficios de los compuestos que se forman durante el tratamiento térmico de los mismos, entre los que destacan los PRM (39).

Las aminas heterocíclicas procedentes de la reacción entre aminoácidos, monosacáridos y creatinina durante el tratamiento térmico de los alimentos representan un potencial factor de riesgo en la etiología del cáncer en humanos (40). En concreto, los procedentes de las carnes rojas asadas o del pescado a la parrilla, que se han relacionado, junto con otros metabolitos tóxicos, con el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de colon y cáncer hepático (41). Además, estas aminas, una vez absorbidas pueden ser transformadas a nivel hepático en compuestos incluso más tóxicos y reactivos y ser reabsorbidos por la microbiota intestinal.

Otro compuesto clasificado como neurotóxico y carcinógeno es la acrilamida. En 2002, investigadores de la Universidad de Estocolmo realizaron un descubrimiento sorprendente: la formación de acrilamida en los alimentos (42). Desde entonces se ha encontrado esta sustancia en una amplia variedad de alimentos procesados a temperaturas elevadas. La acrilamida puede formarse en algunos alimentos durante el proceso de calentamiento, cuando se alcanzan temperaturas de 120 °C o más al freír, tostar o asar. Por ejemplo, inicialmente se descubrió que las patatas fritas, las galletas dulces y saladas, el pan tostado, los cereales de desayuno, las patatas asadas, ciertos productos de confitería y el café la contenían. Las investigaciones posteriores también han hallado acrilamida en

las frutas deshidratadas, las verduras asadas, las aceitunas negras y en algunos frutos secos tostados.

Muchos datos de la bibliografía sugieren efectos mutagénicos o genotóxicos de diferentes mezclas de PRM o melanoidinas capaces de inducir aberraciones cromosómicas en las células ováricas de hamster, conversión de genes en levaduras y mutaciones en *Salmonella typhimurium*.

8.1.7. Efectos alérgicos

Son numerosos los estudios que han demostrado la asociación entre los PRM y el desarrollo de alergias alimentarias, especialmente en la leche (43) y en los cacahuetes (44). Por el contrario, algunas proteínas presentes en frutas como la cereza, la manzana y en horalizas como el apio pueden perder su alergenicidad debido a su unión con carbohidratos reductores durante su tratamiento térmico (45).

8.1.8. Reacción de Maillard in vivo

La reacción de Maillard *in vivo* da lugar a compuestos conocidos como "productos de glicación avanzada" o AGE (del inglés, *Advanced Glication End-products*), que serían realmente los homólogos endógenos de los PRM de la dieta. La formación de estos compuestos en el organismo se produce de forma mucha más lenta, debido a las menores temperaturas, viéndose favorecida por la presencia de hidratos de carbono y proteínas endógenas como el colágeno y las enzimas (39). Su presencia ha sido relacionada con ciertas enfermedades como diabetes, neuropatías, retinopatías, desórdenes oculares como formación de cataratas, glaucoma y degeneración macular, impotencia, fibrosis pulmonar, enfermedades cardiovasculares, o enfermedades neurodegenerativas. Se postula que inducen el estrés oxidativo con el consecuente daño neuronal, provocan la muerte celular programada o apoptosis y están relacionados con el envejecimiento. La relación entre los PRM de la dieta y los AGE endógenos es hoy día motivo de estudio, ya que aún se desconoce si poseen efectos sinérgicos o antagónicos.

8.2. Aminas biógenas

Las aminas biógenas (AB) son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de aminoácidos (46).

Atendiendo a su estructura química se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermita, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterociclicas (histamina, triptamina) y, en función del número de grupo aminos de la molécula, podemos hablar de monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina). Desde un punto de vista biológico, las AB son moléculas con funciones fisiológicas esenciales para los seres vivos. En plantas, la putrescina y algunas poliaminas, como la espermidina y la espermina, están implicadas en diversos procesos celulares de respuesta al estrés y al envejecimiento. En animales están implicadas en procesos tan relevantes como la división celular o la transmisión nerviosa (47). Sin embargo, la descarboxilación de algunos aminoácidos, llevada a cabo por determinados microorganismos, puede provocar la presencia de concentraciones altas de AB en los alimentos, de forma que tras su ingestión pasan a la circulación sanguínea desde donde ejercen diversos efectos tóxicos. Las AB más frecuentes en alimentos son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, triptamina, β-feniletilamina, espermina y espermidina, si bien, las intoxicaciones alimentarias más frecuentes están relacionadas con la histamina y la tiramina, cuyos aminoácidos precursores son la histidina y tirosina, respectivamente.

La intoxicación por histamina es la más conocida, existiendo referencias desde finales del siglo XIX sobre la incidencia de esta enfermedad, conocida como enfermedad escombroide debido se producía tras la ingestión de pescados escómbridos. La intoxicación producida por tiramina se conoce también como reacción del queso, debido a los altos niveles que esta AB presenta en algunos quesos. Además de su propia toxicidad, estudios recientes han demostrado que la tiramina favorece la adhesión de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 a la mucosa intestinal (48). Por otro lado, diaminas como putrescina y cadaverina pueden reaccionar con nitritos dando lugar a la formación de nitrosaminas de conocido efecto cancerígeno. Cabe destacar que hay personas especialmente sensibles a las AB debido a que los enzimas responsables de su destoxificación, la monoamino oxidasa (MAO) o la diamino oxidasa (DAO) no son funcionales, bien por problemas genéticos o por la presencia de inhibidores como el alcohol o determinados fármacos antidepresivos. Por tanto, es difícil establecer los niveles tóxicos para cada una de las AB ya que depende de la eficacia de los sistemas de destoxificación y por lo tanto varía de unos individuos a otros. Además, también depende de la presencia de otras AB ya que pueden tener efectos sinérgicos. Sin embargo, aunque en la actualidad no existe una ninguna legislación sobre las concentraciones permitidas en los alimentos, las autoridades sanitarias recomiendan reducir al máximo la ingestión de estos compuestos. En el caso de personas con tratamientos antidepresivos basados en inhibidores de la MAO está

contraindicado el consumo de queso, debido a los altos niveles de tiramina que puede contener. No obstante, es necesario subrayar que las concentraciones de AB varían no sólo de un tipo de alimento a otro, sino también dentro de un mismo tipo de alimento. Así por ejemplo, se han encontrado dentro de un mismo tipo de queso, variaciones que van desde 90 mg/kg hasta 2.100 mg/kg (49).

La presencia de AB en alimentos debe de atribuirse a la acción microbiana sobre la fracción proteica de la materia prima y más específicamente a las reacciones de descarboxilación de los aminoácidos precursores llevadas a cabo por determinadas bacterias. Por lo tanto, hay dos factores clave para su acumulación en los alimentos: la presencia de las bacterias con actividad aminoacildescarboxilasa y la disponibilidad de los sustratos de la reacción. Los alimentos que presentan una mayor posibilidad de contener AB son aquellos que contienen una elevada carga proteica, aunque también en este aspecto será necesaria la intervención de los microorganismos y de su maquinaria proteolítica para liberar los aminoácidos precursores. La presencia de actividad aminoacildescarboxilasa implicada en la síntesis de AB es una característica que depende de cada cepa bacteriana y no de la especie. Pueden ser bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas y se pueden encontrar representantes en especies de diversos géneros como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigellla*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus, Kocuria*, *Morganella, Vibrio* e incluso en bacterias reconocidas generalmente como seguras, como las pertenecientes a los generos *Lactobacillus*, *Pediococcus* o *Lactococcus*. En el caso de alimentos no fermentados serán bacterias contaminantes, principalmente Gram negativas, las responsables de la síntesis de AB. Algunos autores han sugerido que en este tipo de alimentos la concentración de AB podría ser considerada como un indicador de la carga microbiana. Por lo tanto, la solución pasa por una correcta manipulación y conservación de los alimentos, de forma que se evite la contaminación y proliferación microbiana. Mención aparte merecen los alimentos y bebidas fermentados en los que intervienen bacterias lácticas (vino, sidra, productos lácteos, encurtidos, embutidos...) donde, además de a los microorganimos contaminantes, la actividad descarboxilasa puede estar asociada a las bacterias que forman parte del cultivo iniciador o de la microbiota secundaria. Por lo tanto, la incapacidad de sintetizar AB debe ser incluida entre los criterios de selección de los cultivos iniciadores (50-52).

La sintomatología más frecuente de la intoxicación histamínica (Tabla 6) es una ligera hipotensión arterial, picor, enrojecimiento y edema facial, dolor de cabeza, e incluso diarrea. La aparición de estos síntomas varía entre algunos minutos y varias horas desde la ingestión. Normalmente, todos los síntomas remi-

ten entre las 12 y las 24 horas sin dejar secuelas. En los casos más graves puede producir calambres, náuseas sin vómitos y diarrea, así como espasmos bronquiales, sofoco y trastornos respiratorios graves que suelen confundirse con una crisis alérgica.

La histamina es común en muchos alimentos como pescado, quesos, vinos o embutidos. Para el pescado existe una normativa específica que fija los límites entre 100 y 200 ppm. Esta concentración puede doblarse en productos de pesca salados; por ejemplo, las semiconservas de anchoa y productos similares. Este aumento se debe a que el proceso de elaboración en estos alimentos se basa en la acción de microorganismos y enzimas sobre el producto fresco. Las especies de pescado más implicadas son el atún, las sardinas, las caballas, los arenques y los boquerones, todas ellas de elevado consumo en nuestro país, tanto frescos como en conserva o en sal.

Analizadas las causas de la intoxicación, es evidente la importancia del control y prevención de la contaminación por manipulación del pescado. Se debe tener en cuenta que en nuestro país el consumo de este producto es muy elevado y se suman las altas temperaturas estivales, con lo que el riesgo de su presencia en pescado fresco durante el verano es muy alto.

Tabla 6. *Principales aminas biógenas en los alimentos y sus efectos en humanos*

Amina biógena	**Efectos**
Histamina	Síntesis de noradrenalina y adrenalina Palpitaciones Vómitos, náuseas
Tiramina	Hipertensión Migrañas Vasoconstricción Lacrimación y salivación Aumento de la glucemia Parálisis de las extremidades
Putrescina y cadaverina	Rigidez mandibular Bradicardia Hipotensión Potencia el efecto de otras aminas
β-feniletilamina	Hipertensión Migrañas
Triptamina	Hipertensión

Por lo que respecta a los quesos, los aminoácidos libres presentes en elevadas concentraciones en los quesos fuertemente proteolizados pueden ser descarboxilados a aminas biógenas por enzimas de microorganismos presentes en el queso, con los consiguientes efectos perjudiciales sobre la salud del consumidor. Así, se han encontrado concentraciones de histamina próximas a 1000 mg/kg en algunos quesos españoles tales como Cabrales, Idiazábal y Roncal (53), cifras elevadas teniendo en cuenta que se considera que 75 mg de histamina son suficientes para provocar síntomas en el 50% de voluntarios sanos (54). En cualuier caso, resulta difícil pronunciarse sobre unos niveles de histamina en queso que sean tolerables para garantizar la seguridad del producto, ya que son diversos los problemas añadidos: 1) No ha habido pronunciamiento alguno por parte ningún organismo sobre un límite de este tipo en queso. 2) No hay consenso en la literatura científica sobre cuáles son los niveles de histamina en queso que serían seguros para el consumo, a pesar de que se ha sugerido un límite máximo legal de 100 mg de histamina por Kg de alimento. 3) Se sabe que la toxicidad de la histamina es potenciada por la presencia de otras aminas biógenas que normalmente se encuentran también en cantidades muy variables en los quesos y otros alimentos.

En los vinos se han detectado hasta 24 aminas diferentes, siendo la putrescina la más abundante, seguida de la isoamilamina, histamina, tiramina y feniletilamina en concentraciones decrecientes. El rango de concentración de aminas totales en vinos se extiende desde pocos miligramos a 50 mg/L, dependiendo del vino (24, 39). En general, los vinos tintos contienen una concentración más alta de aminas que los vinos blancos. Recientemente, se han descrito cantidades de hasta 48 mg/L de aminas biógenas en vinos españoles o portugueses. En relación con la reglamentación, en España no existe una norma específica para el contenido de aminas en vinos, a diferencia de otros países europeos en los que sí que existen recomendaciones sobre límites máximos para la histamina en vino: Alemania (2 mg/L), Bélgica (5-6 mg/L), Francia (8 mg/L) y Suiza (10 mg/L). Esta situación ha hecho aparecer barreras a la exportación de algunos vinos españoles a dichos países. Además, la presencia de estas sustancias afecta a las propiedades organolépticas del vino. Así, los consumidores habituales de vino, cuando son sometidos a una disciplina de cata, son capaces de detectar defectos organolépticos presentes en el vino, asociados a ciertos compuestos químicos originados por una fermentación maloláctica sin control, como es el caso de la putrescina y la cadaverina.

Como en el resto de alimentos, la síntesis de aminas biógenas en los vinos supone la coincidencia de tres factores diferentes: la existencia de precursores

(aminoácidos), la presencia de bacterias lácticas con la actividad descarboxilasa correspondiente y la concurrencia de las condiciones ambientales adecuadas (55, 56). La existencia de aminoácidos se encuentra cualitativa y cuantitativamente ligada a las materias primas y a la tecnología de vinificación. Para empezar, depende lógicamente de la concentración inicial en el mosto y está en función de la variedad de uva, del momento de la vendimia, del estado de maduración de la uva, entre otros factores de producción. Un segundo origen puede estar en la adición de nutrientes en forma de aminoácidos o de nitrógeno inorgánico utilizado por las levaduras para su producción. La maceración del mosto con piel y semilla de la uva permite la transferencia de más compuestos nitrogenados a la fracción líquida, tanto más cuanto más larga e intensa es la maceración. Esta transferencia se incrementa en el momento del prensado. La adición de pectinasas y proteasas también aumenta la concentración de aminoácidos. Cuando hay lisis de microorganismos, especialmente de las levaduras, hay una liberación de proteínas, péptidos y aminoácidos tanto más importante como intensa es la lisis. Finalmente, la crianza sobre lías acaba por redondear el escenario de las situaciones que originan la presencia de aminoácidos libres en el vino.

El segundo factor mencionado al principio es la presencia de los microorganismos con actividades descarboxilásicas adecuadas. Los que contribuyen en mayor medida son las bacterias lácticas, pero de manera diferente. En cuanto a la histamina, *Oenococcus oeni* es la especie con un porcentaje más alto de cepas que poseen el gen *hdc*, codificante para la histidina descarboxilasa y catalizador de la síntesis de histamina (aproximadamente un 80% de las cepas). Afortunadamente, estas cepas suelen tener actividades de histidina descarboxilasa bajas y no aumentan demasiado la cantidad de histamina en el vino. Raramente producen más de 5 mg/L en el vino. Por el contrario, *Pediococcus parvulus* y *Lactobacillus hilgardii* (16 y 27% de cepas productoras de histamina, respectivamente) pueden producir entre 40 y 50 mg/L en el vino. Algunos lactobacilos, e incluso leuconostocs, también pueden producir cantidades intermedias de histamina. En relación con la tiramina, tenemos una situación similar, a excepción de no encontrarse cepas de *O. oeni* productoras de tiramina. Un 78% de cepas de *Lactobacillus brevis* producen tiramina, y un 25% de *L. hilgardii*. Se ha visto, además, que existe una correlación entre la síntesis de tiramina y feniletilamina, quizá porque el mismo enzima cataliza ambas actividades. Por lo que refiere a la putrescina, esta es la amina biógena más abundante, pero también se ha observado que hay una notable producción por parte de la vid, de modo que en mosto ya se puede encontrar en cantidades significativas. En ocasiones, también se produce síntesis microbiana, pero no es tan habitual.

En general, desde un punto de vista científico parece claro que la presencia de cantidades elevadas de histamina y otras aminas puede indicar una mala práctica de elaboración, ya sea porque se han utilizado materias primas de baja calidad higiénica o porque se han dado contaminaciones microbianas a lo largo del proceso de elaboración o de distribución. Dado que se ha estimado que un 20% de la población puede ser sensible a la histamina, sería bueno que las industrias alimentarias aceptaran el reto de elaborar alimentos con niveles bajos de histamina y otras aminas biógenas y, eventualmente de la misma manera que se hace con la presencia de alérgenos, considerar la declaración del contenido de histamina en el etiquetado. En esta línea, ya se comercializan en Europa algunos productos que declaran en la etiqueta, como alegación de calidad, la ausencia de histamina o su presencia en niveles bajos. En España, esta práctica ya se lleva a cabo en ciertos tipos de vinos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. IFST (1993) *Shelf life of foods. Guidelines for its determination and prediction*. London: Institute of Food Science & Technology.
2. Forsythe, S. J. & Hayes, P. R. (1998) *Food hygiene, microbiology and HACCP*. Gaithersburg: Aspen Publishers.
3. Sanders, T. A. B. (1994) Nutritional aspects of rancidity. In J. C. Alien, & R. J. Hamilton (Eds.), *Rancidity in food* (pp.128-140). London: Blackie Academic & Professional.
4. Forsythe, S. J. (2000) *Alimentos seguros: microbiología*. Zaragoza: Editorial Acribia.
5. Dainty, R. H. (1996) Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology,* 33: 19-33.
6. ICMSF (1998) *Microorganismos de los alimentos*. Zaragoza: Editorial Acribia.
7. Kilcast, D. & Subramanian, P. (2003) *The stability and shelf-life of food*. Boca Raton: CRC Press.
8. Dainty, R. H. & Mackey, B. M. (1992) The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology.* **73:** 103S-114S.
9. Ruiter, A. (1999) *El pescado y los productos derivados de la pesca: composición, propiedades nutritivas y estabilidad*. Zaragoza: Editorial Acribia.
10. Kraft, A. A. (1992) *Psychrotrophic bacteria in foods: disease and spoilage*. Boca Raton: CRC Press.

11. Liston, J. (1992) Bacterial spoilage of seafood. In H. H. Huss, M. Jacobsen, & J. Liston (Eds.), *Quality assurance in the fish industry* (pp. 93-105). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

12. Dalgaard, P. (1995) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology.* **26:** 319-333.

13. Ward, D. R. & Baj, N. J. (1988) Factors affecting the microbiological quality of seafoods. *Food Technology.* **42(3):** 85-89.

14. Subburaj, J., Darunasagar, I. & Karunasagar, I. (1984) Incidence of histidine decarboxylating bacteria in fish and market environs. *Food Microbiology.* **1:** 263-267.

15. Mossel, D. A. A., Moreno, B. & Struijk, C. B. (2006) *Microbiología de los alimentos* (2ª ed.). Zaragoza: Editorial Acribia.

16. Berrang, M. E., Brackett, R. E. & Beuchat, L. R. (1989) Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. *Journal of Food Protection*. **52:** 702-705.

17. Wells, J. M. & Butterfield, J. E. (1999) Incidence of *Salmonella* on fresh fruits and vegetables affected by fungal rots or physical injury. *Plant Diseases.* **83:** 722-726.

18. Friedman, M. (1996) Food browning and its prevention: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **44:** 631-653.

19. Yaylayan, V. A. (1997) Classification of the Maillard reaction: A conceptual approach. Trends *in Food Science and Technology.* **8:** 13-18.

20. Cremer, D. R. & Eichner, K. (2000) The reaction kinetics for the formation of Strecker aldehydes in low moisture model systems and in plant powders. *Food Chemistry*. **71:** 37-43.

21. Weenen, H. (1998) Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chemistry.* **62:** 393-401.

22. Delgado-Andrade, C., Seiquer, I. & Navarro, M. P. (2006) Changes in calcium absorption and subsequent tissue distribution induced by Maillard reaction products. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **86:** 271-278.

23. Sarriá, B. & Vaquero, M. P. (2004) Iron bioavailability from powdered and in-bottle-sterilized infant formulas in suckling and weanling rats. *Nutrition.* **20:** 788-793.

24. Rerat, A., Calmes, R., Vaissade, P. & Finot, P. A. (2002) Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig. Significance for man. *European Journal of Nutrition.* **41:** 1-11.

25. Kato, Y., Matsuda, T., *Kato*, N., Watanabe, K. & Nakamura, R. (1986) Browning and insolubilization of ovalbumin by the Maillard reaction with some aldohexoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **34:** 351-355.

26. Finot, P. A. (1993) Toxicology of non enzymatic browning. In Macrae, R., Robinson, R., & Sadler, K. M. J. *Encyclopedia of food science, food technology, and nutrition.* London: Academic Press.

27. Dworschak, E. (1980) Nonenzyme browning and its effect on protein nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* **13:** 1-40.

28. Oste, R. E., Miller, R., Sjostrom, H. & Noren, O. (1987) Effect of Maillard reaction products on protein digestion. Studies on pure compounds. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry.* **35(6):** 938-942.

29. Seiquer, I., Díaz-Alguacil, J., Delgado-Andrade, C., Muñoz, A., Galdó, G. & Navarro, M. P. (2006) Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11-14 y. *American Journal of Clinical Nutrition.* **83(5):** 1082-1088.

30. Lowry, K. R., Fly, A. D., Izquierdo, O. A. & Baker, D. H. (1989) Effect of heat processing and storage on protein quality and lysine bioavailability of a commercial enteral product. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition.* **14:** 68-73.

31. García-Baños, J. L, Del Castillo, M. D., Sanz, M. L., Olano, A. & Corzo, N. (2005) Maillard reaction during storage of powder enteral formula. *Food Chemistry.* **89:** 555-560.

32. Ford, J. E., Hurrell, R. F. & Finot, P. A. (1983) Storage of milk powders under adverse conditions. 2. Influence on the content of water-soluble vitamins. *British Journal of Nutrition.* **49:** 355-364.

33. Singh, S., Gamlath, S. & Wakeling, L. (2007) Nutritional aspects of food extrusion: a review. *International Journal of Food Science and Technology.* **42:** 919-929.

34. Killeit, U. (1994) Vitamin retention in extrusion cooking. *Food Chemistry.* **49:** 149-155.

35. Navarro, P., Aspe, T. & Seiquer, I. (2000) Zinc transport in Caco-2 cells and Zinc in rats: Influence of the heat treatment of a casein-glucose-fructose mixture. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry.* **48:** 3589-3596.

36. Mossine, V. V. & Mawhinney, T. P. (2007) Nα-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-L-histidine (D-Fructose-L-histidine): a potent copper chelator from tomato powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **55:** 10373-10381.

37. Rendleman, J. A. (1987) Complexation of calcium by the melanoidin and its role in determining bioavailability. *Journal of Food Science.* **6:** 1699-1705.

38. Delgado-Andrade, C., Seiquer, I. & Navarro, M. P. (2004) Bioavailability of iron from a heat treated glucose-lysine model food system: assays in rats and in Caco-2 cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **84:** 1507-1513.

39. Somoza, V. (2005) Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an update. *Molecular Nutrition & Food Research.* **49:** 663-672.

40. Skog, K. I., Johansson, M. A. & Jägerstad, M. I. (1998) Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Journal of Food Chemistry and Toxicology.* **36:** 879-896.

41. Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H. & Nagao, M. (2004) Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science.* **95:** 290-299.

42. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. & Törnqvist, M. (2002) Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **50(17):** 4998-5006.

43. Kaminogawa, S., Kumagai, Y., Yamauchi, K., Iwasaki, E., Mukoyoma, T. & Baba, M. (1984) Allergic skin reactivity and chemical properties of allergens in two grades of lactose. *Journal of Food Science.* **4:** 529-35.

44. Chung, S. Y. & Champagne, *E. (*1999) Allergenicity of Maillard reaction products from peanut protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* **47:** 5227-5231.

45. Gruber, P., Vieths, S., Wangorsch, A., Nerkamp, J. & Hofmann, T. (2004) Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **52:** 4002-4007.

46. Fernández, M. & Álvarez, M. A. (2005) Las aminas biógenas en los alimentos. *CTC Alimentación.* **26:** 84-90.

47. Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J. & Huis in´t Veld, J. H. J. (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in food. *International Journal of Food Microbiology.* **11:** 73-84.

48. Lyte, M. (2004) The biogenic amine tyramine modulates the adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to intestinal mucosa. *Journal of Food Protection.* **6:** 878-883.

49. Roig-Sagués, A. X., Molina, A. P. & Hernández-Herrero, M. M. (2002) Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research and Technology.* **215:** 96-100.

50. Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. & Vidal-Carou, M. C. (2000) Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of Fuet sausages. *Journal of Food Protection.* **63:** 237-243.

51. Lonvaud-Funel, A. (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Letters.* **199:** 9-13.

52. Suzzi, G. & Gardini, F. (2003) Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology.* **88:** 41-54.

53. Fernández, M., del Río, B., Linares, D. M., Martín, M. C. & Alvarez, M. A. (2006) Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production. *Journal of Dairy Science.* **89:** 3763-3769.

54. Wohrl, S., Hemmer, W., Focke, M., Rappersberger, K. & Jarisch R. (2004) Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. *Allergy and Asthma Proceedings.* **25:** 305-311.

55. Ferrer, S. & Pardo. I. (2005) Prevenció de l'aparició d'amines biògenes en vins. *ACE Revista d'Enologia.* **70:** 6-8.

56. Woller, R. (2005) Amines biògenes: presencia en el vi i efectes en l'organisme. *ACE Revista d'Enologia.* **70:** 9-13.

3. Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos

ROSARIO MARTÍN DE SANTOS

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

1. INTRODUCCIÓN

En el inicio del siglo XXI, la contaminación microbiana de los alimentos sigue constituyendo uno de los principales problemas asociados a su consumo. Los alimentos pueden transmitir diversos microorganismos y metabolitos microbianos, algunos de ellos patógenos para el hombre. En ocasiones, estos microorganismos se encuentran en los alimentos como consecuencia de su presencia en los tejidos de los animales vivos o de los vegetales antes de su recolección. Sin embargo, con mayor frecuencia, los microorganismos llegan a los alimentos durante su obtención o en las operaciones a que éstos se someten posteriormente (1, 2). La contaminación de los alimentos con microorganismos patógenos tiene implicaciones graves desde un punto de vista de la salud pública. El impacto económico asociado a la presentación de las enfermedades de transmisión alimentaria de etiología microbiana, más conocidas como toxiinfecciones alimentarias (TIA), es considerable con pérdidas millonarias para el sector público y privado (destrucción de *stocks*, cierre de empresas, pérdidas de horas de trabajo, hospitalización, medicamentos, investigación epidemiológica, indemnizaciones, etc.). Sólo en EE.UU., más de 76 millones de personas al año sufren alguno de estos procesos. Aunque cualquier individuo es susceptible de padecer una TIA, los principales grupos de riesgo son los niños, ancianos, mujeres gestantes, los positivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), personas sometidas a tratamientos de quimioterapia y, en general, individuos con problemas de inmunidad. Asimismo, preocupa el hecho cada vez más constatado de que del 1-5% de las personas que padecen cuadros de TIA sufren con posterio-

ridad secuelas crónicas (3): enfermedades reumáticas, neuromusculares, síndrome urémico hemorrágico, hipertiroidismo severo, enfermedad inflamatoria intestinal, etc. El coste económico anual derivado de la presentación de estas enfermedades en Estados Unidos se sitúa entre los 10 y 83 billones de dólares (4).

Hace dos décadas, la lista de microorganismos causantes de TIA incluía un número reducido de especies, entre las que se encontraban, por ejemplo, *Salmonella* Typhy y Paratyphi, *Shigella* spp., *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y el virus de la Hepatitis A. Desde entonces, a la lista se han incorporado nuevos patógenos como *Campylobacter* spp., *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium DT104, *Listeria monocytogenes*, las cepas verotoxigénicas de *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, astrovirus, rotavirus, norovirus, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum* y priones, entre otros (5). Con frecuencia, los patógenos emergentes sobreviven a los sistemas de conservación y tratamientos culinarios tradicionales. Por ejemplo, aunque la refrigeración y la acidificación pueden resultar muy útiles para el control de los patógenos clásicos, resultan insuficientes para controlar a algunos emergentes. Por ello, es importante la implantación de sistemas barrera en los que la acción sinérgica de diversos factores subletales (tratamiento térmico, temperatura de almacenamiento, atmósferas modificadas, aditivos, bacteriocinas, etc.) permita la obtención de alimentos seguros. Otro hecho a tener presente es la marcada tendencia de estos microorganismos a formar biopelículas. Los microorganismos se adhieren a las superficies mediante la síntesis de polisacáridos extracelulares y son numerosas las experiencias que ponen de manifiesto la gran protección que encuentran los microorganismos en las biopelículas frente al uso de desinfectantes como el cloro y otros antimicrobianos (6).

Además del control en los alimentos de la presencia de microorganismos patógenos, la comercialización de alimentos exentos de alteraciones constituye también una de las principales preocupaciones de las industrias alimentarias. Se considera que la principal causa de alteración de los alimentos se debe a la proliferación en ellos de bacterias, levaduras y mohos. La alteración generalmente se manifiesta por la aparición de olores y sabores anómalos, defectos en el color, apariencia y textura, y otras características que hacen que el alimento sea inaceptable para su consumo. Aunque no se dispone de datos precisos, se estima que más del 25% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden debido a la acción alterativa de los microorganismos. Este hecho conlleva graves implicaciones económicas para el sector, ya que las mermas que ocasiona el deterioro de materias primas y productos elaborados obliga a decomisar y, en

ocasiones, a retirar del mercado grandes partidas de productos. Las industrias que se ven mayoritariamente afectadas por problemas de alteración son las que producen y comercializan alimentos altamente perecederos como la carne y pescados frescos, la leche pasteurizada o los vegetales crudos. Debido a su composición y características físico-químicas, estos alimentos son muy susceptibles al ataque microbiano y requieren de unas condiciones especiales de mantenimiento. La refrigeración, sola o combinada con diferentes estrategias de conservación y envasado, es sin duda el método más generalizado para retrasar los cambios alterativos y mantener la calidad y seguridad de estos productos. Por estos motivos, las industrias alimentarias son cada vez más conscientes de la importancia que tiene el correcto seguimiento de unas buenas prácticas higiénicas en el marco de la implantación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC). El Sistema APPCC es la herramienta de seguridad alimentaria más extendida y reconocida a escala internacional. El Reglamento Comunitario 852/2004 de 29 de abril de 2004 (DOUE de 25 de junio de 2004) (7) sobre higiene de los productos alimenticios contempla, en su artículo 5, la obligatoriedad para los operadores de las empresas alimentarias de aplicar y mantener un sistema de autocontrol basado en los principios del APPCC. La finalidad de este sistema es identificar, evaluar y controlar los peligros relevantes que puedan aparecer durante la obtención, preparación, transformación, elaboración, manipulación y puesta a la venta o suministro al consumidor final de los productos alimenticios. En las industrias alimentarias, la implantación de sistemas de aseguramiento de la calidad basados en el APPCC, requieren del análisis de un gran número de muestras y de la obtención rápida de resultados que permitan aplicar acciones correctoras rápidas en la cadena de fabricación. Por ello, el sector productivo, transformador, comercial y la propia Administración deben disponer de métodos rápidos que permitan garantizar la seguridad microbiológica de los alimentos que se comercializan (8).

Los primeros métodos rápidos de análisis microbiológico comenzaron a ser utilizados por microbiólogos clínicos en la década de 1960, continuando su desarrollo en décadas sucesivas hasta llegar al momento actual. Su aplicación al análisis de los alimentos comenzó unos 10 años después de que lo hiciera en el ámbito clínico y aunque su expansión inicialmente fue más lenta, en la última década los desarrollos han sido espectaculares. Cronológicamente, a la etapa comprendida entre 1965 y 1975 correspondió el desarrollo de los sistemas de miniaturización de las técnicas microbiológicas convencionales y la aparición de los primeros *kits* diagnósticos. De 1975 a 1985, las técnicas inmunológicas se desarrollaron rápidamente y en el periodo que abarca de 1985 a 1995 irrumpieron las técnicas genéticas y en especial la reacción en cadena de la polime-

rasa (PCR), cuya aplicación marcó un punto de inflexión importante en el análisis microbiológico, tanto de muestras clínicas como de alimentos. A las últimas décadas corresponden los desarrollos en biosensores, *microarrays*, etc. Este último tipo de técnicas surgieron en respuesta a las necesidades que generaron en su momento el proyecto del genoma humano y el desarrollo de la proteómica y de otros campos relacionados (9).

Un interesante estudio de mercado realizado en el año 2003 por la empresa *Strategic Consulting Inc's*, (10), muestra la importancia del análisis microbiológico en el sector alimentario mundial. Según los datos publicados, del total de ensayos microbiológicos realizados en el mundo en el año 2003 (1136,5 millones de análisis), 558,1 millones correspondieron a la industria alimentaria, seguida de la industria farmacéutica (206,9 millones), cosmética (194,3 millones), bebidas (102,4 millones), medio ambiente (44,8 millones) y otros sectores industriales (30 millones). Con relación a la industria alimentaria, en este estudio se incluyen datos interesantes como los referidos a que el 20% de los análisis microbiológicos realizados se centraron principalmente en un reducido número de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria*. El 80% de los análisis restantes hicieron referencia a los recuentos de aerobios, coliformes, enterobacterias, mohos y levaduras. A nivel mundial, el porcentaje de ensayos realizados en Europa, América del Norte y el resto del mundo se distribuía equitativamente con un 33% para cada una de las tres áreas consideradas. No obstante, se estima que en un futuro próximo el porcentaje de ensayos realizados en zonas diferentes de Europa y América del Norte podría incrementarse hasta un 50% debido a la mayor concienciación que los países en vías de desarrollo están adquiriendo sobre la importancia del control microbiológico de materias primas y productos procesados en el ámbito de la seguridad alimentaria.

Los principales requisitos que deben cumplir los métodos rápidos y automatizados de análisis microbiológico de los alimentos, pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Exactitud en la obtención de resultados de acuerdo a los requerimientos establecidos: sensibilidad, límites de detección mínimos, especificidad del sistema de análisis, versatilidad, aplicación potencial y comparación con métodos de referencia.
- Rapidez: tiempo mínimo requerido para la obtención de resultados, número de muestras procesadas en cada ensayo, por hora y por día.
- Coste mínimo: inicial, por análisis, reactivos, trabajo.

- Aceptabilidad: por parte de la comunidad científica y de las agencias reguladoras de los sistemas analíticos.
- Sencillez de manejo: preparación de la muestra, funcionamiento del equipo analítico y procesamiento informático de los datos.
- Cualificación y formación del personal adecuada para la técnica a realizar.
- Reactivos: facilidad de preparación, estabilidad, disponibilidad.
- Fiabilidad del método: avalada por la compañía u organismo responsable de la técnica analítica.
- Soporte técnico adecuado: rapidez, disponibilidad y coste.
- Mínimo espacio útil requerido.

Conviene considerar que, en la mayoría de los casos, el empleo de métodos rápidos de análisis microbiológico de los alimentos no excluye la etapa previa de enriquecimiento del microorganismo diana resultando, en ocasiones, también necesario que los resultados positivos obtenidos con métodos rápidos no validados sean confirmados con los métodos de referencia establecidos. Asimismo, es de suma importancia al igual que acontece en el caso de los métodos microbiológicos tradicionales, la realización de una adecuada toma y preparación de las muestras que se pretendan analizar. Con relación a este último aspecto, destacan los siguientes avances realizados en la última década (9):

- Para muestras sólidas se han desarrollado instrumentos gravimétricos que realizan automáticamente las diluciones programadas de las muestras de alimentos que se quieran analizar. Algunos ejemplos de equipos comercializados son el *Gravimetric Diluter* de Spiral Biotech, Bethesda, Md., USA y el *Dilumacher* de PBI, Milán, Italy. También se han diseñado homogeneizadores que funcionan mediante ondas de choque y una intensa agitación que permite una mejor transferencia de los microorganismos del alimento al diluyente, produciendo una mínima destrucción de la muestra (*Pulsifier* de Microgen Bioproducts Ltd, Surrey, UK).
- Para muestras líquidas se han desarrollado equipos que permiten realizar de forma automatizada diluciones seriadas de una muestra problema. El sistema *Rapid Plate 96 Pipettting Workstation* de Zymark Corpo., Hopkinton, Mass, USA, es ampliamente utilizado en muchos laboratorios de análisis microbiológico de los alimentos.
- Para muestras de superficie se han fabricado esponjas prehidratadas diseñadas para obtener muestras de lugares de difícil acceso. *SpongeSicle* y

Extend-A-Sicle, de Biotrace Internacional, WA, USA, son algunos ejemplos. Otro sistema que ha tenido una amplia aceptación es el conocido como método manos libres "*Hands-free, pop-up adhesive method*" desarrollado por Fung *y col*., (11) para la obtención de muestras de la superficie de canales mediante el empleo de una cinta adhesiva.

- Para muestras de aire encontramos instrumentos portátiles que aspiran un volumen determinado de aire y recogen los microorganismos en la superficie del agar de placas de contacto, permitiendo de este modo estimar su calidad microbiológica. Algunos ejemplos de equipos comercializados son el *SAS sampler* de PBI y el *MAS 100 Air Sampler* de EM Science, Darmstadt, Germany.

En este capítulo se revisan los principales avances realizados en el desarrollo de métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. Estas aplicaciones se han dividido en seis grupos que incluyen: recuento de células viables, sistemas miniaturizados y *kits* de diagnóstico, medición de la biomasa microbiana, técnicas inmunológicas y genéticas y otros avances.

2. AVANCES EN LOS RECUENTOS DE CÉLULAS VIABLES

El recuento de células viables de alimentos, superficies y del aire de las industrias alimentarias, es un parámetro importante en el control de calidad de los alimentos. Tradicionalmente, el método estándar de recuento en placa ha sido ampliamente utilizado en los últimos 100 años en microbiología de los alimentos. Sin embargo, aunque sencillo, resulta laborioso, requiere de un volumen considerable de tubos de ensayo, pipetas, preparación de grandes volúmenes de medio para las diluciones, así como de espacio para el almacenamiento y la incubación de las placas de cultivo. Como consecuencia de estas limitaciones, en los últimos 20 años se han registrado distintos avances entre los que se incluyen los sistemas de siembra en espiral, *Isogrid, Petrifilm*, *Redige*l, automatización del método del Número Más Probable (NMP), etc., que permiten simplificar el proceso (9).

2.1. Sistema de siembra en espiral (Spiral Plating Method, Spiral Biotech, Bethesda, Md., USA)

Permite de forma rápida obtener el recuento de células viables mediante el uso de una aguja de siembra que distribuye en forma de espiral una muestra líquida en

la superficie de una placa con agar (los medios de cultivo utilizados pueden ser o no selectivos). Esta espiral de "Arquímedes" produce un gradiente de concentración que va decreciendo desde el centro hasta la periferia de la placa a medida que rota sobre sí misma. El volumen de muestra que se deposita en cada zona de la placa es conocido y el tiempo requerido en realizar esta operación es de segundos, lo que contrasta con el elevado tiempo empleado en un sistema de siembra manual. Una vez que se ha depositado la muestra, la placa se incuba a la temperatura adecuada para permitir el crecimiento de los microorganismos diana. El recuento puede realizarse manualmente o mediante un sistema automatizado (contador láser). Entre las ventajas de esta técnica, destacan los costes relativamente bajos del material requerido, sencillez en su realización, ahorro de tiempo, así como minimización de errores debido a la automatización del método de recuento. El principal inconveniente descrito está relacionado con la posible obstrucción de la aguja de siembra con partículas pertenecientes a la matriz del alimento. En la actualidad se comercializan nuevas versiones del equipo original como el *Autoplater* (Spiral Biotech) y el *Whitley Automatic Spiral Plate* (Microbiology Internacional, Rockville, Md., USA) que realizan de forma automatizada todas las operaciones.

2.2. Sistema Iso-Grid (QA laboratories Ltd., San Diego, Calif., USA)

Está aceptado por la *AOAC International* para la enumeración de bacterias, mohos y levaduras en muchos tipos de alimentos. Este sistema emplea un filtro de membrana (0,45 μm de tamaño de poro) que lleva impreso una rejilla de características hidrofóbicas que delimita 1.600 cuadrados. Las líneas hidrofóbicas de la rejilla actúan como barreras que impiden la extensión de las colonias. El método requiere la utilización de unidades de filtración que se colocan en un soporte y se conectan a un sistema de vacío. En primer lugar se realiza una filtración de la muestra a través de la unidad de filtrado (5 μm de tamaño de poro), mediante la aplicación de vacío, con el fin de eliminar partículas del alimento. La muestra prefiltrada pasa al filtro con rejilla hidrofóbica, y tras aplicar nuevamente vacío, éste se coloca sobre el medio de cultivo seleccionado. Finalizada la incubación, el analista puede considerar el cuadrado que presenta crecimiento como una única colonia y así proceder a contar el número total de positivos en los 1.600 compartimentos.

2.3. Sistema Petrifilm (3M Co., St. Paul, Minn., USA)

Es un ingenioso desarrollo que utiliza medios de cultivo deshidratados sobre películas plásticas de tamaño y grosor similar al de una tarjeta de crédito

existiendo equipos para la lectura automatizada de los resultados (Lector de placas 3M *Petrifilm*, 3M). El medio deshidratado contiene además de los compuestos selectivos para adaptar su uso a propósitos concretos, un componente que permite la gelificación en frío y colorantes para la tinción de las colonias desarrolladas, facilitando su identificación y recuento. El medio deshidratado puede incluir sustratos para detectar microorganismos que presenten una actividad enzimática concreta. El medio se rehidrata al añadir la dilución de la muestra a analizar. Esta técnica requiere de la adaptación de la composición del medio y condiciones de trabajo al alimento del que se parta, así como al tipo de microorganismos que se pretendan aislar. La principal ventaja del método *Petrifilm* consiste en que no requiere preparación previa de los medios de cultivo, lo que reduce costes y tiempo de preparación.

2.4. Sistema Redigel (3M Co., St. Paul, Minn., USA)

Consiste en una serie de tubos que contienen un medio nutritivo líquido estéril y un gel de pectina. Debido a que el medio no contiene agar, no se necesita la aplicación de calor para fundirlo y conseguir su transformación a medio sólido. Para prepararlo, solo se requiere mezclar 1 ml de la muestra a analizar con el medio nutritivo presente en el tubo. El contenido resultante se dispensa en unas placas de Petri recubiertas con calcio. La pectina del medio nutritivo procedente del tubo reacciona con el calcio de la placa y se produce la gelificación en frío. La placa se incuba convenientemente y el recuento de colonias se realiza de forma análoga al método de recuento estándar en placa.

2.5. Sistema SimPlate (BioControl, Bellevue, Wash., USA)

Se basa en el empleo de una placa de plástico circular con 84 pocillos. Para el análisis de muestras con recuentos elevados, se emplean placas de 198 pocillos. La siembra se realiza en el centro de un reservorio en el que se dispensa 1 ml de la muestra de alimento convenientemente diluida y 10 ml del medio líquido rehidratado proporcionado por el fabricante. La mezcla (alimento/medio) se distribuye homogéneamente en los pocillos mediante movimientos circulares de la placa. Después de 24 horas de incubación a 35 ºC, la placa se sitúa bajo una fuente de luz ultravioleta. Los pocillos que presentan fluorescencia se consideran positivos. El número de pocillos positivos se convierte en valores del NMP gracias a la utilización de tablas de conversión.

Aunque la mayoría de los métodos de recuento mencionados están diseñados para la enumeración de microorganismos aerobios, el Dr. Fung, en los años 80 desarrolló un método ingenioso y sencillo para el recuento de microorganismos anaerobios, conocido como "doble tubo de Fung", que permite lograr instantáneamente condiciones de anaerobiosis en el medio de cultivo y que no requiere sistemas generadores de hidrógeno ni jarras de anaerobiosis (12).

2.6. Sistemas de recuento en tiempo real

Los sistemas previamente descritos facilitan la realización del recuento microbiano y disminuyen el tiempo necesario para la obtención de resultados. Sin embargo, necesitan un tiempo de incubación variable para que los microorganismos crezcan y pueda realizarse el recuento. En la actualidad, se han desarrollado métodos para la realización de recuentos microbianos prácticamente en tiempo real basados principalmente en la citometría de flujo o en el empleo de colorantes fluorescentes que permiten distinguir células vivas de muertas mediante un microscopio (13).

2.6.1. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica óptica rápida y sensible que permite detectar células individuales en matrices complejas así como medir distintas características fisiológicas de las mismas. En este método, las células se hacen pasar una a una por un citómetro y sobre ellas se hace incidir un haz de luz láser. Cuando esto ocurre, la luz se dispersa y también es absorbida por los microorganismos. El grado y la naturaleza de la dispersión del haz de luz, originada por propiedades intrínsecas de las células, puede registrarse y analizarse con un sistema de lentes y células fotoeléctricas. De este modo, se realiza una estimación del número, tamaño y forma de los microorganismos. También se pueden detectar específicamente grupos microbianos concretos (14, 15). Para ello, la citometría de flujo se puede combinar con la utilización de anticuerpos específicos marcados con fluorescencia o con sondas específicas de oligonucleótidos (16).

Entre las ventajas de la citometría de flujo se pueden citar su rapidez, ya que pueden realizarse mediciones de millones de células por minuto, evita la necesidad de recurrir a etapas de enriquecimiento y/o cultivo de las muestras y

puede emplearse con fines tanto cualitativos como cuantitativos. Debido a su gran sensibilidad, la citometría de flujo resulta muy útil en la detección de concentraciones bajas de microorganismos específicos en fluidos. Las principales limitaciones de este método están relacionadas con el elevado coste de los equipos, la ausencia de conocimiento del marcaje específico de las distintas células microbianas y la dificultad en el procesado de los datos obtenidos. Por último, la adecuada preparación de las muestras a analizar constituye un paso fundamental para la obtención de datos fiables debido a que la similitud morfológica entre ciertas células y partículas del alimento puede dificultar la interpretación de los resultados. Actualmente, un citómetro de flujo permite realizar numerosas mediciones cuantitativas con una elevada sensibilidad sobre células individuales dentro de poblaciones complejas. Los modernos equipos comerciales que pueden encontrarse en hospitales y laboratorios especializados realizan mediciones rutinarias de fluorescencia a distintas longitudes de onda sobre miles de células por segundo (9).

2.6.2. Epifluorescencia directa sobre filtro

Esta técnica se basa en la filtración de la muestra a través de una membrana de policarbonato donde quedan retenidos los microorganismos (la muestra previamente se trata con detergentes y enzimas proteolíticas con el fin de evitar la saturación del filtro con partículas del alimento). Posteriormente, la membrana se tiñe con naranja de acridina, que es un fluorocromo nucleofílico que origina distintos patrones de fluorescencia en el ADN y el ARN dependiendo de la fase de crecimiento celular. Los filtros teñidos se observan en un microscopio de fluorescencia y los recuentos de microorganismos se obtienen mediante el contaje de las partículas fluorescentes en un número determinado de campos de fluorescencia. Las células viables emiten una fluorescencia que va del naranja al rojo y las células muertas emiten fluorescencia verde (17-19). Las preparaciones, una vez teñidas, se mantienen estables durante aproximadamente un mes permitiendo su análisis en instalaciones mejor equipadas, si fuese necesario. Actualmente, existen sistemas automatizados de filtrado, tinción y recuento automáticos que facilitan la labor de los analistas. Además, la introducción de analizadores de imágenes permite el análisis de un mayor número de muestras (9). El equipo automatizado *Cobra 2024 Automated Aystem* (Biocom, Paris, France) emplea aproximadamente una hora en analizar 150 muestras. A pesar de su rapidez, su límite de detección oscila entre 2×10^4 y 1×10^6 células/ml.

3. AVANCES EN SISTEMAS MINIATURIZADOS Y KITS DE DIAGNÓSTICO

Los sistemas miniaturizados surgen a partir del concepto de placa microtituladora (96 pocillos, formato 8x12), que permite reducir el volumen de reactivos y medio a emplear en los ensayos. Asimismo, es posible estudiar en un formato manejable el efecto de un compuesto sobre un gran número de aislados, o el de una serie de compuestos sobre un aislado determinado. Esta línea de investigación ha permitido desarrollar algunos de los medios de cultivo selectivos que se encuentran en el mercado actualmente (9). Entre los sistemas miniaturizados de identificación microbiana disponibles en la actualidad, basados en el metabolismo de sustratos específicos por parte de los microorganismos y su detección mediante diversos sistemas indicadores, destacan los siguientes: tarjetas desechables para la identificación sencilla de colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas rápidas como el *OBIS* (*Oxoid Biochemical Identification System*, Cambridge, UK); galerías que permiten la identificación de más de 800 especies de bacterias y levaduras como el *sistema API* (BioMérieux Hazelwood, Mo, USA); tubos de plástico con compartimentos que contienen agar con distintos sustratos y con una aguja en su interior que posibilita la inoculación del tubo de forma rápida y sencilla a partir de una única colonia como el *BBL Enterotube* y *Oxi/Ferm Tube* (BD Becton, Dickinson and Company, NY., USA); y soportes plásticos con pocillos de fácil inoculación que contienen sustratos cromogénicos y/o fluorogénicos en estado deshidratado que se rehidratan en contacto con la muestra (*BBL Crystal*, BD Becton, Dickinson and Company, USA; *RapID systems* y *MicroID*, *Remel KS,* USA; *Biochemical ID systems*, Microgen Bioproducts, Surrey, UK).

Uno de los sistemas miniaturizados y automatizados más conocidos es el sistema *VITEK* (BioMérieux Hazelwood, Mo, USA) que, basándose en cambios de color de los sustratos o en la producción de gas de los cultivos inoculados en los pocillos de una tarjeta plástica que contiene los sustratos bioquímicos en forma deshidratada, puede identificar *Escherichia coli* en 2-4 h. Una rapidez similar en la obtención de resultados puede obtenerse con el sistema *Biolog* (AES Chemunex, Rennes, France) que detecta la capacidad de los microorganismos para oxidar 95 fuentes de carbono. Los patrones metabólicos posibles permiten, además de la identificación, el establecimiento de relaciones filogenéticas entre distintos aislados. El empleo de un único cromógeno como indicador rédox, el violeta de tetrazolio, que se reduce de forma irreversible a formazán (color violeta) como consecuencia de la actividad metabólica bacteriana, facilita la lectura visual de los resultados. En cualquier caso, la mayoría de los sistemas citados

en esta sección ofrecen la posibilidad de lectura e interpretación de resultados de manera automatizada.

Para la automatización del método del Número Más Probable (NMP) se han desarrollado tarjetas de material plástico que contienen 3 grupos de 16 pocillos, con un logaritmo de diferencia en volumen para cada grupo de pocillos, y medios de cultivo con indicadores fluorescentes (*Tempo*, BioMérieux, Hazelwood, Mo, USA). Este sistema disminuye considerablemente la necesidad de reactivos, espacio y tiempo con respecto al método del NMP convencional.

4. AVANCES EN LOS EQUIPOS DE MEDIDA DE LA BIOMASA MICROBIANA

En las últimas décadas también se han desarrollado métodos para estimar de manera indirecta el número de microorganismos presentes en los alimentos. El desarrollo de dichos métodos está íntimamente ligado al de la instrumentación necesaria para detectar las señales relacionadas con el crecimiento microbiano. El principio en el que se basan estos sistemas consiste en que dichas señales (niveles de ATP, enzimas específicas, pH, impedancia, etc.) se modifican con el crecimiento microbiano. Conviene destacar que para que las mediciones sean significativas es necesario establecer la correlación entre estos parámetros y el recuento estándar de células viables.

4.1. Bioluminiscencia o medida del ATP

Todas las células vivas contienen ATP, que se degrada muy rápidamente mediante autolisis al morir las células. En presencia de la enzima luciferasa y el sustrato luciferina (procedentes de la luciérnaga), oxígeno y magnesio, el ATP facilita el paso de la luciferina a oxiluciferina, generándose luz (bioluminiscencia) que puede ser detectada mediante un luminómetro (13). La cantidad de luz emitida en esta reacción es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra, es decir, al número de células vivas, y puede ser utilizada para estimar la biomasa celular de una muestra (la cantidad de ATP de una unidad formadora de colonia oscila entre 0,22 y 1,03 fentogramos). Algunos equipos pueden detectar entre 100 y 1000 fentogramos. En un principio esta metodología se utilizó para estimar el número de células viables de una muestra. Sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios porque distintos microorganis-

mos poseen diferentes concentraciones de ATP por célula (las levaduras pueden tener 100 veces más de ATP que las bacterias); incluso para un mismo microorganismo la cantidad de ATP por célula depende de su fase de crecimiento, y el ATP residual del alimento puede interferir en los resultados. Actualmente, estos problemas se han intentado paliar separando los microorganismos del alimento empleando métodos físicos como la filtración y extrayendo y destruyendo selectivamente el ATP no microbiano mediante la adición de surfactantes y enzimas.

En los últimos años, el mayor campo de aplicación de esa tecnología en la industria alimentaria está relacionado con la monitorización de la higiene de superficies (20). En este ámbito, la presencia de altos niveles de ATP de cualquier origen (microbiano o no) es indicativa de una limpieza deficiente. En la actualidad, existen numerosos sistemas que utilizan dispositivos del tipo escobillón o hisopo para la toma de muestras y luminómetros portátiles, sensibles y fáciles de utilizar que ofrecen lecturas rápidas (en menos de 1 min) del nivel de ATP. Algunos ejemplos de equipos comerciales son: *Lumac* (Landgraaf, Netherland), *BioTrace* (Plainsboro, N.J., USA), *Lightning* (BioControl, Bellevue, Wash., USA), *Hy-Lite* (EM Science, Darmstadt, Germany), *Charm 4000* (Charm Sciences, Malden, Mass., USA), *Celsis system SURE* (Cambridge, UK), *Zylux* (Maryville, TN., USA), *Profile 1* (New Horizon, Columbia, Md., USA). Todos estos equipos permiten aplicar las acciones correctoras establecidas en el plan de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) antes de que se contamine el producto (21, 22).

4.2. Impedimetría

La impedancia es la resistencia al paso de una corriente alterna a través de un material conductor, como puede ser un medio de cultivo. Cuando los microorganismos crecen, metabolizan sustratos no iónicos de baja conductividad (proteínas, carbohidratos y grasas) convirtiéndolos en metabolitos iónicos de una conductividad mayor (ácidos grasos, aminoácidos y ácidos orgánicos). Por tanto, la degradación metabólica de sustratos o nutrientes por los microorganismos durante su crecimiento en un medio de cultivo produce cambios en la resistencia eléctrica del mismo. Mediante su monitorización o registro automatizado es posible estimar la actividad metabólica de células viables de una forma más rápida que con las técnicas tradicionales (13, 23). La actividad metabólica de los microorganismos se estima en términos de "tiempo de detección", que es el tiempo transcurrido desde que comienza la medición hasta que se produce un cam-

bio en el parámetro eléctrico seleccionado. Cuando el tiempo de detección se calibra frente a una población de microorganismos determinada mediante métodos convencionales, la electrometría permite estimar el recuento de microorganismos presentes en un alimento. Como es de esperar, elevados recuentos se relacionan con tiempos de detección cortos. Puesto que se conoce que para que estos cambios tengan lugar debe alcanzarse una población crítica de aproximadamente 10^6 ufc/g, es posible estimar la población inicial de la muestra a partir del tiempo necesario para la detección de dichos cambios.

Desde la introducción de las técnicas electrométricas, se han desarrollado numerosas aplicaciones prácticas (9), especialmente enfocadas hacia la disponibilidad de equipos automatizados comerciales tales como el *Bactometer* (Bio-Merieux, Hazelwood, Mo., USA), *Malthus system* (Crawley, UK) y *Rabit* (*Rapid Automated Bacterial Impedance Technique,* Bioscience, Bethesda, Md., USA).

4.3. Turbidimetría

La turbidimetría o nefelometría es una técnica utilizada para evaluar el crecimiento de un cultivo microbiano. Se basa en la propiedad de las partículas de pequeño tamaño de refractar la luz incidente. Dentro de ciertos límites, existe una relación entre la cantidad de luz que atraviesa una suspensión celular y el número de microorganismos presentes en ella. La mayoría de los colorímetros y espectrofotómetros utilizados para medir la turbidez de un cultivo, efectúan las lecturas en forma de absorbancia, calculándose el crecimiento microbiano por el aumento de ésta con el tiempo. Sin embargo, cuando se alcanzan valores elevados de absorbancia, la relación deja de ser lineal. Para realizar medidas de soluciones densas es necesario emplear un nefelómetro, que mide directamente la luz difractada. Si no se dispone de este instrumento, conviene realizar diluciones del cultivo para realizar las medidas de absorbancia dentro del margen de linealidad del aparato. Otra de las limitaciones de la técnica la constituye la sensibilidad, ya que no es capaz de detectar niveles de concentración inferiores a 10^5 ufc/ml y únicamente es aplicable si se considera la población celular homogénea y uniformemente distribuida por el medio. Además, su aplicación en el análisis de alimentos, se ha visto muy limitada por la gran cantidad de partículas presentes en los alimentos y por su opacidad. La comercialización de un turbidímetro (Bioscreen Analysis System; Labsystems, Helsinki, Finland) ha permitido establecer una relación más exacta entre los datos turbidimétricos y el crecimiento microbiano en las muestras de alimentos.

El principio de la dispersión de la luz también es el fundamento del *Automicrobic system* (AMS, Vitek System, Inc.), que emplea medios selectivos y un sistema óptico para la detección e identificación de enterobacterias en tan solo 12 horas. Las especies del género *Bacillus* se pueden identificar con este equipo en 24 horas. *BioSys* (BioSys, Inc., Ann Arbor, Mich., USA) es un equipo automatizado que registra los cambios de color que se producen en el medio como consecuencia del crecimiento de los microorganismos.

4.4. Otros equipos automatizados

Además de los sistemas ya mencionados, existen otros para la detección del crecimiento microbiano que se basan en la detección colorimétrica del CO_2 producido por los microorganismos en un medio líquido utilizando algoritmos y equipos complejos. Un ejemplo es el equipo *BacT/Alert Microbial Detection System* comercializado por Organon Teknika, Durham, N.C., USA.

5. AVANCES EN LA AUTOMATIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

La utilización cada vez más generalizada de las técnicas inmunológicas en el análisis de los alimentos para detectar la presencia de microorganismos, toxinas u otros metabolitos microbianos, es consecuencia del éxito previo que alcanzaron en el campo del diagnóstico clínico. Las técnicas inmunológicas son procedimientos analíticos basados en la visualización objetiva de la interacción entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo, y debido a su sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo coste, son especialmente útiles en el análisis microbiológico de los alimentos (24, 25). En el desarrollo de un ensayo inmunológico se identifican tres etapas fundamentales: 1) preparación del antígeno; 2) obtención y evaluación del anticuerpo y 3) desarrollo de un inmunoensayo apropiado.

En la detección inmunológica de microorganismos, como antígenos para la inmunización de los animales se pueden utilizar células viables, células inactivadas por el calor u otros procedimientos, células sonicadas, proteínas purificadas de la pared celular o del flagelo en microorganismos móviles, lipopolisacáridos, ADN, etc., (26, 27). Una vez seleccionado el antígeno, la obtención de anticuerpos requiere el empleo de animales de experimentación. Cuando un an-

tígeno se inocula en un animal (conejo, oveja, cabra, etc.), éste responde con la producción de una mezcla heterogénea de anticuerpos frente a distintos epítopos del antígeno y por ello reciben la denominación de anticuerpos policlonales. La obtención de anticuerpos policlonales es sencilla, sin embargo su empleo conlleva una serie de limitaciones entre las que se pueden citar: 1) la obtención de inmunosueros en animales de experimentación es un proceso caro (dependiendo de la especie elegida) y éstos se sacrifican al final de la fase de inmunización, por lo que para obtener más inmunosuero habrá que inmunizar nuevos lotes de animales; 2) cada animal presenta una respuesta inmunológica diferente; 3) algunas técnicas de purificación de anticuerpos como la cromatografía de afinidad, aunque eficaces, son tediosas de realizar y 4) los anticuerpos policlonales específicos purificados constituyen una mezcla de inmunoglobulinas que pueden variar en su afinidad por los distintos epítopos del antígeno (13).

Por ello, el éxito de las técnicas inmunológicas en el análisis microbiológico de los alimentos se ha visto favorecido por el desarrollo de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales (28, 29) que permite disponer de clones de células híbridas o hibridomas que producen, de forma continua e ilimitada, anticuerpos específicos de actividad biológica conocida y especificidad constante. Una de las principales limitaciones que se atribuyen a la utilización de anticuerpos monoclonales deriva del esfuerzo requerido para aislar los hibridomas de interés. Sin embargo, una vez que esto se logra, los hibridomas se pueden mantener "*in vitro"* para obtener los anticuerpos monoclonales de forma ilimitada (30, 31). En los últimos años, la mayor parte de los *kits* que se comercializan para la identificación específica de microorganismos y/o sus toxinas o metabolitos han ido sustituyendo progresivamente los anticuerpos policlonales por los monoclonales. Además, son numerosos los estudios que demuestran que la reproducibilidad de los *kits* comerciales que utilizan anticuerpos monoclonales es superior (27).

De todas las técnicas inmunológicas desarrolladas (aglutinación, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo, inmunofluorescencia, etc.,) la técnica inmunoenzimática de ELISA *(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)* constituye en la actualidad la más ampliamente utilizada en el análisis microbiológico de los alimentos. Se caracteriza por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo. En esta técnica, uno de los elementos de la reacción inmunológica (antígeno o anticuerpo) se fija a un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno, polivinilo, polipropileno o nylon, que permiten su adsorción pasiva y la eliminación de los compuestos libres mediante lavado. En algunos formatos, se utili-

zan membranas de nitrocelulosa como fase sólida, a las que se unen los antígenos mediante enlaces hidrofóbicos. Una vez inmovilizados los antígenos o los anticuerpos, la interacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante la reacción colorimétrica producida por la actividad de una enzima (conjugada al antígeno o al anticuerpo) al degradar el sustrato correspondiente. La medida de la absorbancia en los pocillos de la placa de ELISA permite cuantificar la reacción inmunológica. Las enzimas más utilizadas en las técnicas inmunoenzimáticas son la peroxidasa de rábano, la β-galactosidasa, la glucosa oxidasa y la fosfatasa alcalina.

Las técnicas inmunoenzimáticas se han desarrollado en diversos formatos (ELISA indirecto, ELISA competitivo y ELISA *sandwich*) atendiendo al componente de la reacción que se fija en primer lugar, la fase sólida utilizada, y si se emplean o no concentraciones limitantes de antígeno y anticuerpo (32-34). En la identificación de microorganismos y/o sus toxinas o metabolitos, uno de los formatos más utilizados es la técnica de ELISA sándwich. En esta técnica, el anticuerpo se une a la fase sólida y, después de un periodo de incubación y lavado, se adiciona la muestra que contiene el antígeno. Después de un nuevo lavado que elimina los antígenos que no se han unido a la fase sólida, se añade un segundo anticuerpo marcado con una enzima. La unión del segundo anticuerpo al antígeno se cuantifica por la reacción colorimétrica resultante de la degradación del sustrato por la enzima. Conviene señalar que la mayor parte de estos ensayos requieren de la presencia en la muestra de 10^3-10^5 ufc/gr o ml, lo que implica que previamente a la realización del análisis es necesario proceder a un enriquecimiento de la muestra (16-24 h) que permita la multiplicación del microorganismo diana hasta alcanzar el límite de detección (13, 35, 36).

En los últimos años, muchos laboratorios de diagnóstico han comenzado a comercializar diferentes kits de ELISA para la detección en los alimentos de microorganismos patógenos y/o sus toxinas o metabolitos (9). BioControl (Bellevue, Wash., USA) comercializa el *kit Assurance* EIA para la detección de *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli* O157:H7 y *Campylobacter* en alimentos y muestras ambientales. Tecra OPUS (Internacional BioProducts, Redmond, Wash., USA), Bio-Tek Instrument (Highland Park, Vt., USA), Diffichamb (Hisings Backa, Suecia), Molecular Circuitry Inc. (King of Prussia, Pa., USA) son algunos ejemplos de empresas que comercializan sistemas de detección rápida de patógenos basados en la técnica de ELISA. Entre los equipos que facilitan la automatización completa del proceso, destaca el sistema VIDAS (BioMerieux, Hazelwood, Mo, USA) que permite completar la reacción de ELISA entre 45 minutos y 2 horas dependiendo del microorganismo diana o toxina que se pretenda detec-

tar (37). Puesto que la técnica incorpora un sistema de detección fluorescente recibe el nombre de ELFA (*Elisa Linked Fluorescent Assay*). En la actualidad, el equipo VIDAs permite detectar *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Cronobacter sakazakii*, *Vibrio*, enterotoxinas estafilocócicas y *Campylobacter*.

Uno de los formatos de inmunoensayo que ha tenido mayor desarrollo en los últimos años es el conocido como de flujo lateral. En este formato, la muestra se deposita en un pocillo y, a continuación, ésta difunde por capilaridad a la zona donde se encuentran los anticuerpos marcados con partículas coloreadas. En caso de correspondencia, los complejos anticuerpo-antígeno difunden a otra zona donde está fijado un segundo anticuerpo de captura. Si los anticuerpos son específicos del antígeno diana, el acúmulo de partículas coloreadas retenidas en la zona de captura permite visualizar una línea coloreda. En la zona de validación del test, los anticuerpos que han quedado libres son capturados por un antígeno fijado en el soporte. El proceso completo se desarrolla en 10 minutos con un límite detección de 10^3-10^5 ufc/gr o ml, si bien sigue siendo necesario un enriquecimiento previo de la muestra (8 horas). Reveal System (Neogen, Lansing, Mich., USA) y VIP system (BioControl, Bellevue, Wash., USA) son dos ejemplos de empresas que comercializan este formato para la detección de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria*.

Una de las limitaciones de los inmunoensayos deriva de la necesidad de proceder a un enriquecimiento previo de la muestra que facilite la multiplicación del microorganismo diana. Por ello, un avance importante en la implementación de estas técnicas de análisis microbiológico ha consistido en la introducción de un proceso de inmunocaptura previa. La separación inmunomagnética emplea partículas magnéticas recubiertas de anticuerpos específicos, para concentrar el antígeno de interés como etapa previa a la realización del ELISA. La separación inmunomagnética permite reducir el tiempo requerido para el enriquecimiento de la muestra, así como obtener suspensiones que contengan menor cantidad de partículas del alimento, lo que facilita su procesado posterior mediante distintas técnicas (métodos convencionales, ELISA/ELFA, hibridación con sondas genéticas, PCR, etc.). Una de las empresas pioneras en este campo ha sido Vicam (Somerville, Mass., USA) que comenzó comercializando partículas metálicas que llevaban fijados anticuerpos específicos de *Listeria*. Dynal (Oslo, Noruega) ha desarrollado bolas magnéticas con anticuerpos específicos de *E. coli* O157:H7, *Listeria*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, etc.

6. AVANCES EN LA AUTOMATIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS GENÉTICAS

Los métodos microbiológicos previamente citados están basados en la detección de determinadas características fenotípicas de los microorganismos. La expresión fenotípica de las células está sujeta a condiciones de crecimiento que se ven influidas por la temperatura, pH, presencia de nutrientes, potencial de óxido-reducción, estrés químico y ambiental, actividad de agua, etc. En este sentido, incluso los ensayos inmunológicos dependen de la expresión fenotípica de las células para producir antígenos diana que puedan ser detectados por anticuerpos específicos. Por ello, la mayor parte del diagnóstico microbiológico recae en la detección de la expresión fenotípica de las células y está inherentemente sometido a variación. Por el contrario, los métodos genéticos se dirigen a la detección de características celulares mucho más estables contenidas en los ácidos nucleicos (38).

Una de las técnicas genéticas más sencillas para la identificación de un microorganismo diana en un alimento se basa en la hibridación de sus ácidos nucleicos con sondas genéticas conocidas (oligonucleótidos sintéticos). El sistema *Genetrack* (Framingham, Mass., USA) permite la detección de patógenos como *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* 0157:H7 en alimentos. Inicialmente, estos *kits* utilizaban sondas marcadas con compuestos radiactivos, pero los problemas inherentes a la utilización de estos marcadores (autorizaciones legales para utilizar compuestos radiactivos, instalaciones adecuadas, etc.) dieron paso al empleo de sondas marcadas con enzimas y diseñadas para hibridar en el ARN ribosómico de los microorganismos diana (una célula bacteriana puede contener de 1.000 a 10.000 copias de ARN ribosómico frente a una única copia de ADN cromosómico). Estos ensayos han sido evaluados ampliamente en diferentes laboratorios y la AOAC Internacional los ha aprobado para distintos tipos de alimentos. Más recientemente, *Genetrack* ha adaptado el sistema a placas de pocillos para una mejor automatización del ensayo.

En los últimos años es cada vez más frecuente en los laboratorios de microbiología de los alimentos el empleo de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), para amplificar el ADN de los microorganismos diana y disponer así de una cantidad suficiente que permita su detección (39, 40). Ideada por el científico Kary Mullis a mediados de la década de 1980, esta técnica ha cambiado el curso de las ciencias biomédicas más que cualquier otra técnica desarrollada durante el siglo XX. El gran éxito científico reside en que permite obtener *in vitro* un gran número de copias de fragmentos específicos de

ADN, basándose en mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular. La reacción en cadena de la polimerasa consiste en la repetición cíclica de tres etapas:

1) Desnaturalización del ADN bicatenario presente en la muestra para separar las dos cadenas, mediante la aplicación de temperaturas superiores a 90 ºC.

2) Unión específica de los cebadores (oligonucleótidos sintéticos) a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. La temperatura a la que se realiza esta unión (Ta, *annealing temperature*) es muy importante para controlar la especificidad de la reacción. La Ta depende de la composición de bases y del tamaño de los cebadores. Se suelen emplear dos cebadores que se unen cada uno a una cadena diferente, delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar. La selección de dichos cebadores constituye uno de los puntos más críticos del ensayo de PCR.

3) Extensión de la cadena de ADN a copiar a partir de los cebadores, utilizando los nucleótidos presentes en la solución. Dicha extensión la lleva a cabo la enzima ADN polimerasa, que inicia su actividad tras reconocer la unión de los cebadores a las cadenas de ADN de la muestra.

La polimerasa empleada inicialmente procedía de *Escherichia coli* y se desnaturalizaba cuando se sometía a temperaturas superiores a 90 ºC durante la primera etapa de cada ciclo. Por este motivo, resultaba necesario reponerla al inicio de cada fase de extensión, impidiendo la automatización del proceso. En la actualidad, sin embargo, se utilizan enzimas termoestables como la *Taq* polimerasa, procedente del microorganismo termófilo *Thermus thermophilus*, clonada y purificada a partir de *Escherichia coli*. Después de cada ciclo de amplificación, se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de ADN diana delimitada por la pareja de cebadores específicos. Dado que las nuevas copias sirven como patrones en los siguientes ciclos, la cantidad de ADN generado aumenta exponencialmente. De este modo al final de *n* ciclos, el número de copias de ADN por cada molécula será de 2^n. Un proceso de PCR típico de entre 20 a 40 ciclos permite amplificar un millón de veces, como mínimo, el número de copias del fragmento de ADN diana que exista en la muestra original. Los fragmentos amplificados se detectan fácilmente mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El bromuro de etidio es una sustancia fluorescente que se intercala entre los pares de bases adyacentes del ADN, posibilitando la visualización cuando se ilumina con luz ultravioleta. Cuando los

fragmentos esperados son de un tamaño muy pequeño, se pueden emplear geles de poliacrilamida por su mayor poder de resolución. Conviene señalar que hoy día existen alternativas a la utilización del bromuro de etidio cuya principal ventaja reside en la menor toxicidad de estos compuestos, como sucede con la tinción con *SYBR Safe DNA gel Stain* (Invitrogen, UK).

La utilización de polimerasas termoestables, junto con el diseño de termocicladores (aparatos que permiten llevar a cabo los ciclos de tiempo y temperatura necesarios de un modo rápido), han permitido la completa automatización de la técnica de PCR, facilitando así su empleo rutinario. Otro factor clave para su expansión ha sido la creciente disponibilidad de cebadores específicos (41). Esto ha sido posible gracias a los avances en las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos, que han permitido conocer las secuencias de un número considerable de genes, así como al desarrollo de equipos y reactivos que permiten una síntesis rápida y económica de los mismos.

Actualmente, las técnicas de PCR que se desarrollan en varios pasos, desde la amplificación del material genético al análisis de los productos finales, están evolucionando hacia procedimientos más rápidos y automatizados en un solo tubo. Estos avances en las técnicas de PCR se basan en la utilización de compuestos fluorescentes y presentan numerosas ventajas en el análisis rutinario de los alimentos. Por ejemplo, el tiempo necesario para obtener resultados se reduce, al no requerir el análisis electroforético posterior de los productos de PCR. Además, al realizarse todo el proceso en el mismo tubo, se minimizan las posibilidades de contaminación con ADN exógeno y se facilita la automatización. Por otra parte, el equipo proporciona en tiempo real un resultado no cualitativo, sino numérico, que permite la cuantificación y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos (42). En los últimos años, se han descrito varios tipos de ensayos de PCR en tiempo real que se pueden dividir en dos grandes grupos: sistemas no específicos y específicos. Los sistemas no específicos detectan la presencia o ausencia de amplicones, pero no proporcionan información sobre la identidad de los productos generados. En este tipo de ensayos se incluyen, por ejemplo, los que utilizan “agentes intercaladores fluorescentes” de la doble cadena de ADN. Su principal inconveniente deriva de la posibilidad de producir falsos positivos si aparecen productos de PCR inespecíficos o dímeros de cebadores. Este inconveniente se evita con los sistemas específicos, en los que se emplean diversos tipos de sondas fluorescentes (*Taqman*, *scorpions, molecular beacons*, etc.,) que hibridan específicamente en la secuencia de ADN diana (42).

En la técnica de PCR en tiempo real con sondas *Taqman,* éstas están marcadas con fluorocromos en los dos extremos y son capaces de hibridar en re-

giones internas y específicas de los productos de PCR. El fluorocromo situado en el extremo 5´ se llama *reporter* y el del extremo 3´ recibe el nombre de *quencher*. Cuando la sonda (que se incluye en la reacción de PCR conjuntamente con los cebadores) está íntegra, la proximidad del *reporter* y del *quencher* provoca un fenómeno denominado FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente) que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda. En el curso de la amplificación por PCR, la sonda se une a su secuencia diana cuando ésta se encuentra presente en la reacción. Durante la extensión de la cadena, la actividad 5´exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa, que permite eliminar nucleótidos específicamente desde el extremo 5´ de una cadena de ácido nucleico, provoca la liberación del *reporter* del extremo 5´ de la sonda que al separarse del *quencher* comienza a emitir fluorescencia. La acumulación de los productos de PCR se detecta monitorizando el aumento de la fluorescencia por la liberación del *reporter*. El proceso de hibridación y corte no interfiere con la acumulación exponencial del producto. A medida que aumenta el número de copias del producto, aumenta el de moléculas de sonda que hibridan en su secuencia diana y cada *reporter* se separa de su respectiva sonda, por lo que la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de amplicón generado. Como la sonda sólo se corta si hibrida en la secuencia diana, la fluorescencia generada procede exclusivamente de la amplificación específica de productos de PCR. La ventaja de las sondas Taqman sobre el sistema SYBR Green consiste en que la hibridación específica entre la secuencia diana y la sonda es la que genera la señal de fluorescencia. Con el empleo de las sondas fluorescentes, la amplificación de productos no específicos por la unión de los cebadores a secuencias no diana, o por la producción de dímeros de cebadores, no genera señal. Además, estas sondas pueden marcarse con diferentes fluorocromos *reporter* en el extremo 5´, que se distinguen entre sí porque difieren en sus longitudes de onda de emisión máxima. El empleo simultáneo de sondas marcadas con diferentes *reporters* permite detectar la amplificación de dos o más secuencias diferentes en una misma reacción de PCR, pero puede provocar algún error a la hora de determinar la contribución de cada fluorocromo en la reacción.

Independientemente del sistema empleado, la unión en un solo instrumento de la tecnología de amplificación de ADN mediante PCR, junto a la tecnología de espectrofluorimetría láser, posibilita la detección y cuantificación eficiente, rápida y reproducible de fragmentos específicos de los ácidos nucleicos. El seguimiento de la emisión de fluorescencia al final de cada ciclo de amplificación permite identificar el ciclo umbral (Ct), que es aquel a partir del cual la relación entre la fluorescencia emitida y el número de ciclos es exponencial.

Mediante la elaboración de curvas estándar apropiadas se puede establecer una relación lineal entre el Ct de una muestra y el número inicial de copias de ADN diana en la misma. Las técnicas de PCR descritas han permitido la detección de numerosos microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos (43-52). A continuación se citan algunos ejemplos de los principales *kits* para la detección de patógenos por PCR.

El sistema *BAX* (Qualicon, Inc., Wilmington, Del., USA) es un equipo de detección automatizada de patógenos por PCR. Los cebadores, polimerasa, deoxinucleótidos, control positivo de la reacción e intercalador fluorescente van incorporados en una simple tableta. Se parte de una muestra sometida a enriquecimiento previo (14-18 h) y no se requiere la extracción previa del ADN. El ensayo está disponible para *Salmonella* (53), *Escherichia coli* O157:H7 (54, 55), *Listeria* y *Listeria monocytogenes* (56, 57). Actualmente, también se comercializa para *Criptosporidium parvum* y *Campylobacter jejuni*. Otros ejemplos de sistemas automatizados de PCR en tiempo real son: *iQ-Check*, (Bio-Rad;, CA., USA), *TaqMan Pathogen Detection Kits* of Applied Biosystems (Foster City, Calif., USA), Roche/Biotecon Diagnostics LightCycler, Roche; Warnex, AES Chemunex).

Una de las limitaciones de las técnicas de PCR descritas radica en que la amplificación del material genético se produce tanto en las células viables como en las muertas. Es decir, podemos obtener un resultado positivo a partir de una muestra de alimento en la que todos los microorganismos hayan sido destruidos como consecuencia del proceso tecnológico aplicado. Para resolverlo, cada vez se utiliza más la técnica de PCR que emplea como enzima una transcriptasa inversa. Esta técnica consiste en la detección de ARN mediante su transcripción inversa a ADN complementario (ADNc) y su posterior amplificación mediante PCR. Esta técnica resulta, por tanto, de la combinación de dos procesos bien diferenciados que pueden realizarse en dos o en una única etapa en la que se incorporan simultáneamente todos los reactivos implicados. De hecho, esta técnica resulta de gran utilidad en la detección de virus ARN. Asimismo, el ARN es una molécula mucho más adecuada que el ADN como marcador de viabilidad, debido a que se degrada con mayor rapidez después de la muerte celular, por lo que esta técnica se ha propuesto para la detección e identificación de microorganismos viables, entre los que destacan bacterias patógenas e indicadores de contaminación (49).

Además de las técnicas genéticas propuestas para la detección, identificación y enumeración de los microorganismos presentes en los alimentos, es importante disponer de estrategias para la tipificación y caracterización molecular

de cepas aisladas de diferentes orígenes con el fin de contribuir a un mejor conocimiento sobre la distribución ecológica y las rutas de transmisión de un determinado agente patógeno (59-62). Para ello, partiendo de una colonia de cultivo puro, pueden emplearse procedimientos automatizados basados en la hibridación de sondas específicas con fragmentos de restricción del ADN (Riboprinter, DuPont Qualicon) o técnicas como la electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE), la amplificación de secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (ERIC-PCR), el estudio de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (PCR-RFLP), y el *MultiLocus Sequence Typing* (MLST) para establecer la variabilidad genética y asociación epidemiológica entre cepas de un determinado microorganismo de distintas procedencias (explotaciones ganaderas, mataderos, establecimientos comerciales, etc.).

7. OTROS SISTEMAS

7.1. Biosensores

Un biosensor es un dispositivo compacto de análisis integrado por un elemento de reconocimiento biológico (enzima, orgánulo, tejido, célula, receptor biológico, anticuerpo o ácido nucleico) o biomimético (polímeros de impresión molecular), asociado a un sistema de transducción de señal, que permite empleando el software con los algoritmos apropiados, procesar la señal (eléctrica, óptica, piezoeléctrica, térmica o nanomecánica) producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y la sustancia u organismo que se pretende detectar (analito). Los biosensores se caracterizan por su alta especificidad, sensibilidad, fiabilidad y capacidad de análisis múltiples. Asimismo, se pueden incluir en sistemas integrados de fácil automatización con capacidad para trabajar en tiempo real. Estos dispositivos pueden utilizarse en la detección de biotoxinas (toxinas bacterianas, micotoxinas y toxinas marinas) y microorganismos alterantes y patógenos (bacterias, mohos, levaduras, virus y parásitos) presentes en los alimentos. Aunque las principales aplicaciones de los biosensores van dirigidas a la investigación genómica y la medicina, ya se dispone de dispositivos específicos (basados en la hibridación de ácidos nucléicos y en interacciones antígeno-anticuerpo) para la detección de *Salmonella* spp., Listeria monocytogenes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* y otros microorganismos cuya presencia en los alimentos y/o la de sus toxinas (enterotoxinas estafilocócicas, toxina botulínica, etc.) puede suponer un peligro para la salud de los consumidores (63-67).

7.2. Microarrays

Los microarrays de ADN son dispositivos innovadores recientemente aplicados a la detección e identificación microbianas. Se trata de pequeños dispositivos que contienen de forma ordenada una colección de moléculas biológicas (ácidos nucléicos, proteínas, anticuerpos o tejidos), ordenadas en dos dimensiones e inmovilizadas sobre un soporte sólido. El origen de los microarrays de ADN, también llamados chips de ADN, hay que buscarlo en la automatización y miniaturización de un grupo de técnicas clásicas de hibridación de ADN desarrolladas hace unas décadas: técnicas de Southern y Northern blotting.

Un microarray de ADN es una red muy precisa de alta densidad compuesta de moléculas de ácidos nucleicos de una sola cadena, denominadas "sondas", unidas covalentemente a la superficie de un pequeño soporte sólido. La utilidad del ADN en este formato deriva de la propiedad que tienen las sondas para hibridar, con una elevada especificidad, a una secuencia complementaria. Por ello, los microarrays de ADN pueden emplearse para "interrogar" mezclas complejas de miles de ácidos nucleicos, permitiendo localizar una secuencia diana en una muestra problema (62). Desde su descubrimiento a finales de la década de los 80, los microarrays de ADN han ido progresivamente introduciéndose en las principales áreas de investigación biomédica y biotecnológica como la fisiología, epidemiología, ecología, patogénesis y filogenia microbiana. Sin embargo, no ha sido hasta esta última década cuando ha comenzado a despuntar el empleo de esta tecnología en el ámbito del control de calidad y seguridad microbiológica de los alimentos (68). Aunque su principal aplicación ha sido el análisis de expresión génica, el número de trabajos publicados que describen el desarrollo de chips de ADN para la detección, identificación y caracterización genética de los principales microorganismos patógenos alimentarios va progresivamente en aumento. La utilización pionera de los microarrays de ADN en este campo se llevó a cabo en los laboratorios de la FDA (Food and Drug Administration) para la identificación de bacterias patógenas entéricas (69) y su uso ha ido extendiéndose en los últimos años para el análisis microbiológico de muestras clínicas y de alimentos (68, 70-73).

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Arthur, M. H. (2002) Emerging microbiological food safety issues. *Food Technology.* **56:** 48-51.
2. EFSA (2007) The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal*. **130:** 1-309.
3. Lindsay, J. A. (1997) Chronic sequelae of foodborne disease. *Emerging Infectious Diseases.* **3:** 443-452.
4. USFDA, U.S. Food and Drug Administration. (2001) 2001 Food Code. Washington, D. C.: Food and Drug Administration. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/-dms/fc01-toc.html>. Accessed 18 May 2004.
5. Tauxe, R. V. (2002) Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology.* **78:** 31-41.
6. Schlundt, J. (2002) New directions in food borne disease prevention. *International Journal of Food Microbiology*. **78:** 3-17.
7. DOUE. Diario Oficial de la Unión Europea (2005) Reglamento 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios (DOUE de 25 de junio de 2004).
8. Sharpe, A. N. (1994) Developments in rapid methods for detection of agents of foodborne disease. *Food Research International*. **27:** 237-243.
9. Fung, D. Y. C. (2002a) Rapid methods and automation in microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **1:** 3-22.
10. Anónimo (2004) Fung's forecast on rapid and automated methods: Where are we now? *Food Safey Magazine*, (Agosto-Septiembre). **24-31:** 60.
11. Fung, D. Y. C., Thompson, L. K., Crozier-Dodson, B. A. & Kastner, C. L. (2000) Hands-free "Pop-up" adhesive type method for microbial sampling of meat surfaces. *Journal of Rapid Methods in Automation Microbiology*. **8:** 209-217.
12. Fung, D. Y. C. & Lee, C. M. (1981) Double-tube anaerobic bacteria cultivation system. *Food Science.* **7:** 209-213.
13. Boer, E. & Beumer, R. R. (1999) Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology.* **50:** 119-130.
14. Marie, D., Brussaard, C. P. D., Thyrhaug, R., Brabak, G. & Valout, D. (1999) Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow citometry. *Applied and Environmental Microbiology.* **65:** 45-52.

15. Barbosa, J., Costa-de-Oliveira, S., Rodrigues, A.G. & Pina-Vaz, C. (2008) Optimization of a flow cytometry protocol for detection and viability assessment of *Giardia lamblia*. *Travel Medical Infectious Diseases*. **6:** 234-239.

16. McClelland, R. G. & Pinder, A. C. (1994) Detection of *Salmonella* Typhimurium in dairy products with flow citometry and monoclonal antibodies. *Applied and Environmental Microbiology.* **60:** 4255-4262.

17. Holah, J. T., Betts, R. P. & Thorpe, R. H. (1988) The use of direct epifluorescence microscopy (DEM) and the direct epifluorescence filter (DEFT) to assess microbial populations on food contact surfaces. *Journal of Applied Bacteriology*. **65:** 215-221.

18. Champagne, C. P., Gardner, N. J., Fontaine, J. & Richard, J. (1997) Determination of viable bacterial population in raw milk within 20 minutes by using a direct epifluorescent filter technique. *Journal of Food Protection*. **60:** 874-876.

19. Hermida, M., Taboada, M., Menéndez, S. & Rodríguez-Otero, J. L. (2000) Semiautomated direct epifluorescent filter technique for total bacterial count in raw milk. *Journal of the AOAC International*. **83:** 1345-8.

20. Whitehead, K. A., Smith, L. A. & Verran, J. (2008). The detection of food soils and cells on stainless steel using industrial methods: UV illumination and ATP bioluminescence. *International Journal of Food Microbiology.* **127:** 121-128.

21. Colquhoun, K. O., Timms, S. & Fricker, C. R. (1998) A simple method for the comparison of commercially available ATP hygiene-monitoring systems. *Journal of Food Protection.* **61:** 499-501.

22. Moore, G. & Griffith C. (2002) A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: an industry trial. *International Journal of Environmental Health Research.* **12:** 317-329.

23. Falahee, M. B., Park, S. F. & Adams, M. R. (2003) Detection and enumeration of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by indirect impedimetry with an oxygen scavenging system. *Journal of Food Protection*. **66:** 1724-1726.

24. Samarajeewa, A. U., Wei, C. I., Huang, T. S. & Marshall, M. R. (1991). Application of immunoassay. *Food Science and Nutrition*. **29:** 403-434.

25. Lee, H. A. & Morgan, M. R. A. (1993) Food immunoassays: Applications of polyclonal, monoclonal and recombinant antibodies. *Trends in Food Science and Technology*. **4:** 129-133.

26. Labadie, J. & Desnier, I. (1992) Selection of cell wall antigens for the rapid detection of bacteria by immunological methods. *Journal of Applied Bacteriology*. **72:** 220-226.

27. González, I., Martín, R., García, T., Morales, P., Sanz, B. & Hernández, P. E. (1998) Polyclonal antibodies against live cells of *Pseudomonas fluorescens* for the

detection of psychrotrophic bacteria in refrigerated meat using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Fleischwirtschaft International*. **4:** 32-35.

28. Köhler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* **266:** 495-497.

29. Köhler, G., Howe, S. C. & Milstein, C. (1976) Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *European Journal of Immunology*. **6:** 292-295.

30. Qian, H., Pang, E., Du, Q., Chang, J., Dong, J., Toh, S. L., Ng, F. K., Tan, A. L. & Kwang, J (2008a) Production of a monoclonal antibody specific for the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni* and characterization of the epitope. *Applied and Environmental Microbiology*. **74:** 833-839.

31. Qian, H., Pang, E., Chang, J., Toh, S. L., Ng, F. K., Tan, A. L. & Kwang, J. (2008b) Monoclonal antibody binding to the major outer membrane protein of *Campylobacter coli. Journal of Immunogial Methods*. **339:** 104-113.

32. Yoshida, M., Maeda, H. & Ifuku, Y. (1991) Rapid detection of yeast in orange juice by enzyme-linked immunosorbent assay. *Agricultural and Biological Chemistry*. **55:** 2951-2957.

33. Yong, R. K. & Cousin, M. A. (1995) Nonspecific enzyme-linked immunosorbent assay for molds in foods. *Journal of Food Science*. **6:** 1357-1363.

34. Hochel, I., Slavicková, D., Viochna, D., Skvor, J. & Steinhauserová, I. (2007) Detection of *Campylobacter* species in foods by indirect competitive ELISA using hen and rabbit antibodies. *Food and Agricultural Immunology*. **18:** 151-167.

35. González, I., Martín, R., García, T., Morales, P., Sanz, B. & Hernández, P. E. (1994a) Polyclonal antibodies against live cells of *Pseudomonas fluorescens* for the detection of psychrotrophic bacteria in milk using a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Dairy Science*. **77:** 3552-3557.

36. González, I., Martín, R., García, T., Morales, P., Sanz, B. & Hernández, P. E. (1994b) Detection of *Pseudomonas fluorescens* and related psychrotrophic bacteria in refrigerated meat by a sandwich ELISA. *Journal of Food Protection*. **57:** 710-714.

37. Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Ray-GuenioT, S., BOutrand-Loeï, S., Meyrand, A. & Richard, Y. (1998) Evaluation of the VIDAS methodology for detection of *Escherichia coli* O157 in food samples. *Journal of Food Protection*. **61:** 917-920.

38. Wells, J. M. & Bennik, M. H. J. (2003) Genomics of food-borne bacterial pathogens. *Nutrition Research Reviews.* **16:** 21-35.

39. Dickinson, J. H, Kroll, R. G. & Grant, A. (1995) The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods. *Letters in Applied Microbiology*. **20:** 212-216.

40. Hill, W. E. (1996) The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **36:** 123-173.

41. Kanikuma, K., Fukusima, M. & Kawaguchi, R. (2003) Detection and identification of *Escherichia coli, Shigella* and *Salmonella* by microarrays using the gyrB gene. *Biotechnology and Bioengineering*. **83:** 721-728.

42. Hanna, S. E., J., Connor, C., J. & Wang, H. H. (2005) Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications and limitations. *Journal of Food Science*. **70:** R49-R53.

43. Soumet, C., Ermel, G., Boutin, P. & Colin, E. (1995) Chemiluminiscencent and colorimetric enzymatic assays for the detection of PCR-amplified *Salmonella* sp. products in microplates. *Biotechniques.* **19:** 792-796.

44. Gutiérrez, R., García, T., González, I., Sanz, B., Hernández, P. E. & Martín, R. (1997) A quantitative PCR-ELISA for the rapid enumeration of bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Applied Microbiology.* **83:** 518-523.

45. Gutiérrez, R., García, T., González, I., Sanz, B., Hernández, P. E. & Martín, R. (1998) Quantitative detection of meat spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction (PCR) and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Letters in Applied Microbiology*. **26:** 372-376.

46. Venkitanarayanan, K. S., Faustman, C., Crivello, J. F., Khan, M. I., Hoagland, T. A. & Berry, B. W. (1997) Rapid estimation of spoilage bacterial load in aerobically stored meat by a quantitative polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*. **82:** 359-364.

47. González, I., García, T., Fernández, A., Sanz, B., Hernández, P. E. & Martín, R. (1999) Rapid enumeration of *Escherichia coli* in oysters by a quantitative PCR-ELISA. *Journal of Applied Microbiology*. **86:** 231-236.

48. González, I., Antolín, A., García, T., Hernández, P. E. & Martín, R. (2000) Development of a combined PCR-culture technique for the rapid detection of *Arcobacter* spp. in chicken meat**.** *Letters in Applied Microbiology*. **30:** 207-212.

49. Mayoral, M. B., Martín, R., Sanz, A., Hernández, P. E., González, I. & García, T. (2005) A reverse transcriptase PCR technique for the detection and viability assessment of *Kluyveromyces marxianus* in yogurt. *Journal of Food Protection*. **69:** 2210-2216.

50. Menard, A., Dachet, F., Prouzet-Mauléon, V., Oleastro, M. & Mégraud. F. (2005) Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to identify the main pathogenic *Campylobacter* spp. *Clinical Microbiology and Infection*. **11:** 281-287.

51. Hein, I., Flekna, G., Krassnig, M. & Wagner, M. (2006) Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *Journal of Microbiological Methods*. **66:** 538-547.

52. Martín, B., Jofre, A., Garriga, M., Pla, M. & Aymerich, T (2006) Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. **72:** 6040-6048.

53. Mrozinski, P. M., Betts, R. P. & Coates, S. (1998) Performance tested methods: Certification process for BAX for screening/*Salmonella*: A case study. *Journal of the AOAC International.* **81:** 1147-1154.

54. Johnson, J. L., Brooke, C. L. & Fritschel, S. J. (1998) Comparison of BAX for screening/ *E. coli* 0157:H7 vs. conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* 0157:H7 in ground beef. *Applied and Environmental Microbiology.* **64:** 4390-4395.

55. Hochberg, A. M., Gerhardt, P. N., Cao, T. K., Ocasio, W., Barbour, W. M. & Morinski, M. (2000) Sensitivity and specificity of the test kit BAX for screening/ *E. coli* 0157:H7 in ground beef: independent laboratory study. *Journal of the AOAC International*. **83:** 1349-1356.

56. Steward, D. & Gendel, S. M. (1998) Specificity of the BAX polymerase chain reaction system for detection of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Journal of the AOAC International.* **81:** 817-822.

57. Norton, D. M., McCamey, M., Boor, K. J. & Wiedmann, M. (2000) Application of the BAX for screening/genus *Listeria* polymerase chain reaction system for monitoring Listeria species in cold-smoked fish and in the smoked fish processing environment. *Journal of Food Protection*. **63:** 343-346.

58. Norton, D. M., McCamey, M., Gall, K. L., Scarlett, J. M., Boor, K. J. & Wiedmann, M. (2001) Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. *Applied and Environmental Microbiology*. **67:** 198-205.

59. Earnshaw, R. & Gidley, J. (1992) Molecular methods for typing bacterial food pathogens. *Trends in Food Science and Technology*. **2:** 39-43.

60. Fernández-Cuenca, F. (2004) Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **2:** 355-360.

61. Karenlampi, R. I., Tolvanen, P. P. & Hanninen, M. L. (2004) Phylogenetic analysis and PCR-restriction fragment length polymorphism identification of *Campylobacter* species based on partial groEL gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. **42:** 5731-5738.

62. Justé, A., Thomma, B. P. H. J. & Lievens, B. (2008) Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*. **25:** 745-761.

63. Wang, J., Rivas, G., Parrado, C., Cai, X. & Flair, M. N. (1997) Electrochemical biosensor for detecting DNA sequences from the pathogenic protozoan *Cryptosporidium parvum*. *Talanta.* **44:** 2003-2010.

64. Seo, K. H., Brackett, R. E., Hartman, N. F. & Campbell, D. P. (1999) Development of a rapid response biosensor for detection of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Protection*. **62:** 431-437.

65. Baeumner, A. J., Cohen, R. N., Miksic, V. & Min, J. (2003) RNA biosensor for the rapid detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. *Biosensors Bioelectronic.* **18:** 405-413.

66. Laczka, O., Baldrich, E., Muñoz, F. X. & del Campo, F. J. (2008) Detection of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* using interdigitated microelectrode capacitive immunosensors: the importance of transducer geometry**.** *Analytical Chemistry*. **80:** 7239-47.

67. Huang, S., Yang, H., Lakshmanan, R. S., Jonson, M. L., Wan, J., Chen, I. H., Wikle, H. C., Petrenko, V. A, Barbarie, J. M. & Chin, B. A. (2009) Sequential detection of *Salmonella typhimurium* and *Bacillus anthracis* spores using magnetoelastic biosensors. *Biosensor Bioelectronic*. **24:** 1730-1736.

68. Rasooly, A. & Herold, K. E. (2008) Food microbial pathogen detection and análisis using DNA microarray technologies. *Foodborne Pathogens and Disease.* **5:** 531-550.

69. Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K. & Levy. D. D. (2001) Microarray analysis of microbial virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*. **67:** 3258-3263.

70. Keramas G., Bang, D. D., Lund, M., Madsen, M., Rasmussen, S. E., Bunkenborg, H., Telleman, P. & Christensen, C. B. (2003) Development of a sensitive DNA microarray suitable for rapid detection of *Campylobacter* spp. *Molecular and Cellular Probes.* **17:** 187-196.

71. Keramas G., Bang, D. D., Lund, M., Madsen, M., Bunkenborg, H., Telleman, P. & Christensen, C. B. (2004) Use of culture, PCR analysis, and DNA microarrays for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from chicken feces. *Journal of Clinical Microbiology*. **42:** 3985-3991.

72. Masson, L., Maynard, C., Brousseau, R., Goh, S-H., Hemmingsen, S. M., Hill, J. E., Paccagnella, A., Oda, R. & Kimura, N. (2006) Identification of pathogenic *Helicobacter* species by chaperonin-60 differentiation on plastic DNA arrays. *Genomics.* **87:** 104-112.

73. Quiñones, B., Parker, C. T., Janda, J. M., Miller, W. G. & Mandrell, R. E. (2007) Detection and genotyping of *Arcobacter* and *Campylobacter* isolates from retail chicken samples by use of DNA oligonucleotide arrays. *Applied and Environmental Microbiology*. **73:** 3645-3655.

4. Biocidas: Datos sobre su evaluación para la salud, industria alimentaria e impacto ambiental

BARTOLOMÉ RIBAS OZONAS

Académico Numerario de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Jefe de Área de Toxicología Ambiental (Jubilado), Instituto de Salud Carlos III

1. INTRODUCCIÓN

El hombre ha tardado milenios en conseguir la tecnología adecuada para la aplicación de *biocidas* y su utilización en la producción, desarrollo tecnológico sostenible y conservación de los alimentos, sin dañar la salud humana y sin perjudicar a la naturaleza. Desde un punto de vista técnico, la solución a los problemas de la humanidad son la investigación, la tecnología y la producción. Es conocido que mil millones de personas pasan hambre y que muere un millón de adolescentes al año, y es responsabilidad de todos resolver este problema. Hoy se sabe que *Salmonella*, importante microorganismo causante de toxiinfecciones alimentarias (TIA), sigue siendo todavía junto con *Campylobacter*, la causa más frecuente de las mismas. Para alcanzar una adecuada calidad de vida y el bienestar de la humanidad, es indispensable la investigación básica y aplicada y cuanto permita el avance de la ciencia agraria, incluida la conservación de alimentos microbiológicamente seguros. De aquí que, la gran variedad de *biocidas* disponibles hayan adquirido un significado trascendental en nuestra sociedad, no solo en la industria sino también en agricultura, en el hogar, en hospitales y en salud pública. Por otro lado, los *biocidas* son también tóxicos para el hombre, se trata de compuestos de una potente actividad biológica, de lo contrario no serían útiles contra los microorganismos, y deben ser controlados, y sus residuos neutralizados y eliminados antes de que los alimentos alcancen las grandes superficies y pequeños comercios. Al mismo tiempo que se requiere el lavado, neutralización y eliminación de *biocidas*, también se incluyen los detergentes y los desinfectantes químicos, mediante las prácticas higiénicas de lim-

pieza y desinfección de fabricación junto con la higiene en los hogares particulares y públicos, prerrequisito imprescindible para tener una población sana.

Además de aplicar *biocidas*, la industria alimentaria trata de establecer sistemas de control de la calidad del producto impidiendo así las toxiinfecciones alimentarias (TIA), y al mismo tiempo mejorar la calidad de los nuevos *biocidas* impidiendo que tanto los residuos de *biocidas* como las bacterias patógenas y sus toxinas lleguen al consumidor. Con la ayuda de la tecnología disponible y aplicando la metodología conocida como métodos de buenas prácticas de laboratorio (GLP), se puede conseguir el aseguramiento de la calidad, algunos de cuyos ensayos expondremos más adelante. Uno de los programas para eliminar peligros y reducir TIA, es el Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (*Hazard Analysis Critical Control Point*, HACCP). Para el control de calidad se ha propuesto lo que se conoce como Gestión de la Calidad Total (*Total Quality Management*, TQM). Algunos han propuesto fundir el HACCP con los programas de Aseguramiento de la Calidad (Serie ISO 9000) (1, 2).

Los alimentos son un medio favorable para el crecimiento de los microorganismos que provocan su deterioro (véase el Capítulo 2 de esta monografía). Precisamente para proteger y evitar su deterioro se aplican *biocidas* que son compuestos antioxidantes o atacan de forma específica mediante interacciones químicas, moléculas esenciales para el metabolismo bacteriano y de otros seres vivos. Numerosos compuestos antioxidantes se encuentran de forma natural en los alimentos y se han incluido en los grupos de compuestos plaguicidas: herbicidas, insecticidas, fungicidas, etc., para impedir el deterioro y la sobremaduración de los alimentos. Por ello estos productos químicos antibacterianos, *biocidas* y conservantes en la industria alimentaria son indispensables para la conservación de los alimentos. Por otra parte, hay que evitar a toda costa que sus residuos contaminen los alimentos al llegar a los puntos de distribución y consumo.

Los *biocidas* evitan el crecimiento de microorganismos y el efecto de sus toxinas en toda una diversidad de soportes, como tuberías, recipientes, aparatos de agitación, mezcla y elaboración y finalmente con ellos se desinfectan los envases que contienen alimentos. Sin embargo, hay que tener bien presente que algunos microorganismos pueden contaminar el equipo de procesado de alimentos, al de envasado y transporte y pueden llegar hasta los consumidores. Como ejemplo citemos a *Cladosporium resinae*, microorganismo que prolifera en los restos de agua de los tanques de acero de la aeronáutica y en otros materiales metálicos e induce a un efecto corrosivo de sus paredes. También en los lubricantes navales mezclados con restos de agua y

mantenidos a elevada temperatura se favorece el crecimiento bacteriano contaminante en sus circuitos (3, 4).

El mecanismo de acción de los *biocidas* se fundamenta en que actúan sobre las moléculas de la membrana de la célula viva, especialmente sobre las proteínas, carbohidratos, lípidos (fosfolípidos), ácidos nucleicos y sobre otras pequeñas moléculas, como algunas vitaminas, hormonas y ciertos elementos minerales esenciales presentes en las células. La aplicación de *biocidas* evita corrosiones y otros accidentes que serían la causa de costes ruinosos. El control del crecimiento bacteriano mediante *biocidas* está aceptado en hospitales, en el hogar y se aplican en Salud Pública, en sanitarios, piscinas, horticultura y aplicaciones higiénicas. Su aplicación es vital para prevenir pérdidas en procesos alimentarios industriales. Un *biocida* tiene efectos sobre los alimentos en sí, en los aparatos, calderas, tuberías y recipientes y otro equipo de los procesos de preparación y envasado; debe prestárseles atención y evitar que sus residuos puedan llegar a la especie humana. Por ello es de interés que revisemos sumariamente la naturaleza, tipos de *biocidas*, efectos, potencia biológica y evaluación del riesgo para la salud humana y del ecosistema.

2. DEFINICIÓN

Se denominan *biocidas* las sustancias químicas naturales o sintéticas, y métodos de naturaleza física o biológica, destinados a la conservación integral de los alimentos con todas sus características de cantidad, calidad y pureza. Es indispensable el consiguiente control cuali- y cuanti-tativo, tanto del *biocida* y de sus residuos en los alimentos, como del tipo de microorganismo para el que se aplique. Son de presentación única y si es heterogénea debe tener acción sinérgica para eliminar todo tipo de contaminación. Su actividad *biocida* persigue destruir, contrarrestar, neutralizar e impedir la acción microbiana o ejercer el control de cualquier especie de organismo nocivo para el fin deseado, por medios físicos, químicos o biológicos.

En la industria alimentaria se aplican además de *biocidas*, compuestos de limpieza y desinfección, algunos de los cuales tienen capacidad bactericida. Las industrias alimentarias deben aplicar estándares higiénicos que se correspondan con el funcionamiento de la empresa, su estructura, construcción y aparataje; pero también con el equipo de personal, su función, formación, especialización y tareas. El objetivo primordial de una empresa alimentaria es producir alimentos en condiciones de limpieza; ésta se ha definido como la eliminación de todo

tipo de suciedad; la suciedad es todo residuo indeseable de alimentos o sus restos, de naturaleza orgánica o inorgánica. Para realizar una buena limpieza y mantener la calidad del producto deben tenerse en cuenta los siguientes aspectos: 1) la naturaleza de la suciedad; 2) naturaleza de la superficie a limpiar; 3) tipo de agente de limpieza, aparato o medio a utilizar; 4) grado de dureza del agua; 5) grado de limpieza requerido. La limpieza puede ir seguida de una desinfección o esterilización de superficies, tuberías, y otros objetos y del arrastre con agua abundante de los productos utilizados (*biocidas*, detergentes y desinfectantes químicos). Definido ya el *biocida*, añadamos que detergente es todo compuesto o producto que ayuda a la limpieza. Desinfectante, es toda sustancia química o compuesto que destruye microorganismos (no necesariamente las esporas bacterianas). Como queda dicho la suciedad en una industria alimentaria, debe eliminarse de superficies, equipos, aparatos, tuberías, vestimenta, como monos, guantes y por último los operarios se lavarán las manos.

La presencia de *biocidas* o de sus residuos en los alimentos representa un "peligro" que convierte el alimento en no apto para el consumo humano. El término de peligro no se refiere únicamente al residuo de un *biocida* sino a cualquier propiedad química, biológica o física, debida a la producción de agentes microbiológicos (bacterias, virus, parásitos, protozoos, micotoxinas); agentes químicos (*biocidas*, productos químicos de limpieza, plaguicidas, alergenos, metales tóxicos, nitritos, nitratos, compuestos N-nitrosos, bifenilos policlorados, residuos de medicamentos, aditivos químicos, migración de plastificantes); y físicos (vidrio, metales, piedras o chinas, madera, plásticos, restos de plagas, insectos) (5). Algunos detergentes y desinfectantes químicos tienen propiedades bactericidas, y cuando se emplean deben someterse a las mismas acciones de lavado, neutralización y eliminación que los *biocidas* (6).

La presentación de estos compuestos está regulada por la Directiva 98/8/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de febrero, relativa a la comercialización de *biocidas*, la cual armoniza en el ámbito europeo la legislación sobre estos productos. Se establecen principios comunes de evaluación y autorización de *biocidas* evitando de esta forma barreras económicas y administrativas. Esta Directiva, ha sido transpuesta a nuestro ordenamiento jurídico mediante el Real Decreto 1054/2002, de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de *biocidas*. Con este Real Decreto, se controlan 23 tipos de productos. Entre ellos se incluyen también los desinfectantes utilizados en los ámbitos de la vida privada y de la salud pública, los insecticidas, acaricidas, rodenticidas, repelentes, conservantes, etc.

Hasta ahora, en base a la legislación existente en España en esta materia (Real Decreto 3349/1983 y posteriores modificaciones, Real Decreto 162/1991 y Real Decreto 443/1994), solo se registraban algunos tipos de productos *biocidas*. No obstante, esta legislación seguirá siendo de aplicación durante el periodo transitorio de 10 años que establece la ya comentada Directiva 98/8/CE (Real Decreto 1054/2002). Durante este periodo se ha establecido un procedimiento de revisión de las sustancias activas *biocidas* comercializadas con anterioridad a mayo de 2000. Esta revisión se llevará a cabo de acuerdo con los Reglamentos de la Comisión Europea (Reglamento (CE) Nº 1896/2000, Reglamento (CE) Nº 2032/2003, Reglamento 1048/2005 y Reglamento (CE) 1849/2006).

En la base de datos del Ministerio de Sanidad y Consumo se puede consultar el listado de *biocidas*; y la Información a cumplimentar por los fabricantes o personas responsables. Cada día que pasa, los *biocidas* tienen mayor significación y aplicación en diversos e importantes ámbitos, como son la industria alimentaria, hospitales, en el hogar, en agricultura y en la industria en general.

3. POTENCIA BIOLÓGICA

La potencia biológica o efectividad de un *biocida* es esencial para su utilización en la industria alimentaria. El criterio para considerar como ideal a un biocida reúne varias características que se concretan en 4 categorías (7):

1. Rendimiento: Con gran efectividad sobre microorganismos diana y con una alta LC_{50} para organismos no diana. Se debe mantener el sistema limpio de depósitos (biofilm). Debe ser posible limpiar y eliminar obstrucciones, atascos y residuos. No debería ser neutralizado por materiales a su paso en sistemas refrigerantes, como: compuestos hidrocarbonados, madera, plásticos, y otros compuestos con otros tratamientos. Finalmente ser efectivos sobre un amplio rango de microorganismos (Figura 1) y condiciones de tratamientos.
2. Medio ambiente: Las reacciones adversas de productos secundarios deben ser reducidas; y sus metabolitos deben ser mínimos y a ser posible ecológicos, no dañinos para el medio ambiente, ni persistentes en el medio natural.
3. Seguridad: De manejo seguro y fácil.
4. Economía: Debe ser económicamente asequible.

Se debe conocer la peligrosidad de una sustancia en relación a la salud humana y del ecosistema, pues todos los *biocidas*, por el simple hecho de ser aplicados deben tener una potencia biológica manifiesta, que permita su uso por su efectividad biológica, y por ello requieren una reglamentación para su control.

La potencia biológica de ciertas moléculas *biocidas* o productos químicos de diversa índole no solo afectan al ser humano a través de sus residuos en alimentos, sino también al medio ambiente (8); con riesgos de contaminación ambiental en sus diferentes facetas y ámbitos (9).

Biocidas activos de diversas estructuras, liberados por distintos motivos en la Naturaleza, con la consiguiente aparición no solo en los alimentos, en el agua potable y niveles freáticos, pueden alcanzar ciertas concentraciones que pueden tener efecto "alterador endocrino". Los alteradores o desreguladores endocrinos son compuestos que pueden tener efectos activadores o inhibidores endocrinos a través de receptores o enzimas, a una dosis diez o cien veces más baja que la de sus efectos tóxicos, por ello se consideran muy significativos y relevantes para el análisis del riesgo.

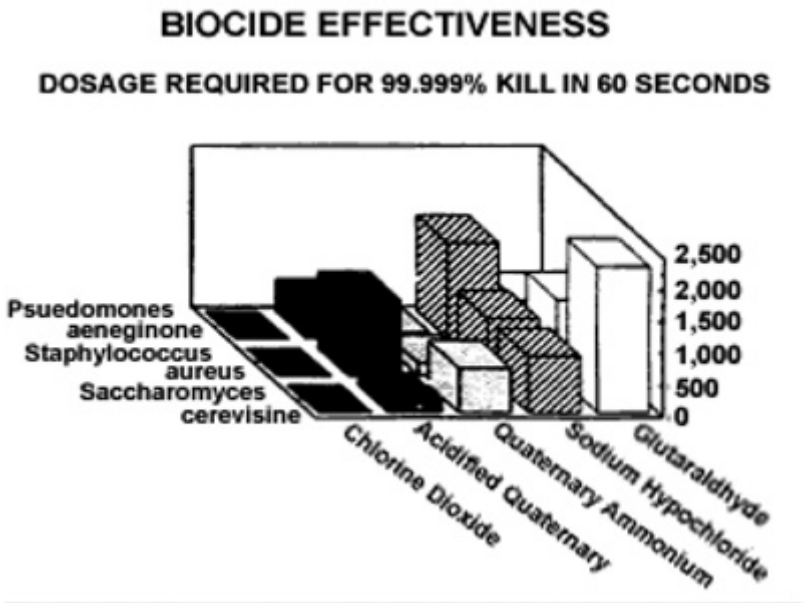


Figura 1. *Comparación de la dosis necesaria para conseguir la reducción bacteriana del 5-log en 60 segundos de tiempo de contacto.*

4. PATOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

La continuidad de las especies en nuestro planeta, necesita que el medio de vida o ambiente actual y para las generaciones futuras, sea sostenible, y para ello debe ser controlado y mantenido correctamente. Se han desarrollado las evaluaciones del riesgo de muchas sustancias, tanto *biocidas* como medicamentos y productos químicos de amplio uso. Algunos *biocidas* y otras sustancias activas o no activas son ecológicas, es decir se destruyen y desaparecen en un tiempo más o menos corto. Otras pueden tener diversas cualidades que las hacen peligrosas para el ser humano, la fauna y la flora. La cualidades más sobresalientes son: persistencia, efectos biológicos potentes, y la cantidad de liberación en el medio ambiente. El desarrollo de las guías de evaluación del riesgo de las sustancias químicas procede de las directrices iniciadas en EE.UU., por su Academia Nacional de Ciencias (10). En España tenemos el Real Decreto 1054/2002, de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas (BOE número 247/2002, de 15 de octubre de 2002).

La presencia de productos químicos en el medio natural tiene efecto sobre los seres vivos. Los agentes tóxicos deben ser metabolizados por la célula viva a su entrada en los hepatocitos del hígado. Los seres vivos se defienden de los productos químicos mediante la oxidación, metilación, acetilación, glucuronidación, sulfatación, etc., con el fin de solubilizarlos, disolverlos y excretarlos a través de la orina y otras vías. Debe tenerse en cuenta la actividad reductora del organismo a través de las actividades enzimáticas superóxido-dismutasa (SOD), glutatión-peroxidasa, glutatión-reductasa, catalasa, metalotioneína, cisteína y otros numerosos compuestos reductores (11).

La cadena de transporte de electrones tiene un gran significado, y su buen funcionamiento bioquímico es esencial porque viabiliza los electrones de los compuestos que son metabolizados por el organismo, sean alimentarios o tóxicos, transformándolos en anhídrido carbónico y agua. Cuando existe una avalancha de electrones por hábitos alimentarios desfavorables, por dieta excesiva o desequilibrada, la cadena de transporte de electrones y el potencial reductor del organismo se halla desbordado con la consiguiente formación de radicales libres. Los radicales libres son moléculas muy reactivas, con carga en desequilibrio y que reaccionan activamente en cualquier tejido provocando efectos desfavorables, como daño tisular y roturas moleculares. Primero provocan un daño silente que al cabo de meses o años se manifiesta mediante signos y síntomas que expresa el organismo que lo padece. Entre las enfermedades que se adscriben a su posible etiología se relacionan algunas en la Tabla 1.

5. ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LOS BIOCIDAS Y AGENTES TÓXICOS

En los ambientes oncológicos y medioambientales se acepta que el 80% de los procesos cancerosos y tumorales obedecen a una etiología ambiental (12). Los agentes tóxicos pueden hacer emerger enfermedades en individuos con predisposición hereditaria, o con hipersensibilidad alérgica, o por inhibición específica de la expresión de ciertos genes, provocándolas durante el periodo embrionario (talidomida y otros agentes tóxicos), o agravándolas durante su curso, como en las enfermedades degenerativas, como Parkinson, Alzheimer, enfermedades reumáticas y otras (Tabla 1).

La avalancha de compuestos contaminantes bióticos y abióticos liberados en el medio ambiente, induce al crecimiento de pláncton, ciertas algas y bacterias, principalmente en lugares tropicales y aguas remansadas marinas. Uno de los ejemplos conocidos por todos son las mareas rojas, el alga *Caulerpa taxifolia*, provocan el descenso de la concentración de oxígeno, fenómeno conocido como eutrofización, con la consiguiente mortalidad de otras numerosas especies. Al aplicar los ensayos homologados con la especie de alga *Scenedesmus capricornutum*, ensayo de garantía de calidad, a muestras de elevado contenido orgánico, se observa que esta especie crece activamente en vez de inhibirse. Algunas especies de algas contienen sustancias muy tóxicas de una potencia bio-

Tabla 1. *Enfermedades que pueden inducir y agravar algunos biocidas y otros agentes tóxi-*

Cáncer
Enfermedades degenerativas: Enfermedad de Alzheimer Parkinson Enfermedades reumáticas
Diabetes
Osteoporosis
Alergias
Inmunodeficiencias
Enfermedades cardiorespiratorias
Arterioesclerosis

lógica extraordinaria, como ciguatoxina, saxitoxina, brevetoxina, verdaderos peligros medio ambientales en países tropicales, para algunos peces y para el hombre (13, 14).

6. EVALUACIÓN DEL RIESGO. TOXICOLOGÍA Y METABOLISMO

Todo *biocida,* como cualquier otro compuesto activo utilizado, con fines antibacterianos, medicamentosos, etc., debe reunir varias condiciones de especificidad, efecto antibacteriano con fundamento químico o genético o basarse en la evidencia.

Hay que evitar que el avance técnico e industrial sea desfavorable no solo para la Salud Pública sino también para la Ecología. Por ello los *biocidas* deben someterse a reglas que en Europa se reflejan en Directivas para el control y la salvaguarda de la salud humana y del medio ambiente. Sin embargo, la liberación masiva de sustancias químicas o medicamentosas al medio natural, pueden revertir incidiendo desfavorablemente en la especie humana, en la fauna y en la flora evidencia clara del riesgo de contaminación ambiental por productos químicos (9). Su impacto en el medio ambiente, es decir en la estructura y función de los ecosistemas, es muy complejo pero interesante para ser tratado independientemente (13, 14).

Debe conocerse la dosis exacta para diversas aplicaciones, frecuencia de aplicación, duración y sus efectos secundarios, peligrosidad, curva de dosis respuesta en las especies necesarias para su aplicación y también el binomio riesgo-beneficio. Otros factores que deben conocerse son:

- Naturaleza, cantidad, ruta metabólica.
- Toxicocinética: absorción, distribución, acumulación, excreción y metabolismo.
- Toxicidad aguda: oral, percutánea y por inhalación.
- Irritación: piel, ojos.
- Sensibilidad: piel.
- Toxicidad a corto plazo: oral 28 y 90 días.

En relación al medio ambiente debe conocerse la potencia biológica del biocida, su persistencia y la cantidad o dosis a utilizar (o utilizada) y liberada con vistas a su neutralización, tratamiento o eliminación.

- Aves: Toxicidad oral aguda y corto plazo (OCDE 206).

- Organismos acuáticos: Toxicidad aguda en peces, toxicidad crónica en peces. Toxicidad para embriones (OCDE210). Bioconcentración en peces (OCDE 305E). Toxicidad aguda y crónica en invertebrados (OCDE 202, parte II). Ensayo en algas; en organismos del sedimento; en plantas acuáticas.
- Artrópodos: Toxicidad para abejas (guía EPPO 170)/2 especies sensibles. En ácaro predador-parasitario.
- Lombrices de tierra: Toxicidad aguda; efectos subletales.
- Organismos del suelo no específicos.
- Otros organismos no específicos (fauna y flora).

7. ENSAYOS TOXICOLÓGICOS Y ECOTOXICOLÓGICOS PARA BIOCIDAS

Para establecer los efectos tóxicos de biocidas, como sustancias simples o complejas, para los seres vivos y el medio ambiente, se utilizan frecuentemente una serie de ensayos con garantía de calidad, homologados e internacionalmente reconocidos, solo nos referiremos a unos pocos (13, 14). Se trata de protocolos legalmente establecidos para la aceptación universal de resultados y sus conclusiones. Para el control del riesgo ambiental debe estimarse el posible impacto sobre la estructura y función de los ecosistemas para cada agente tóxico individual (15), también la evidencia del riesgo de contaminación ambiental por productos químicos (9). Los resultados pueden expresarse en forma cualitativa y cuantitativa con la valoración del nivel de incertidumbre de la determinación o estimación (16).

7.1. Determinación del efecto tóxico de las sustancias

CE_{50} y DL_{50} con diversos ensayos.

7.2. Bioensayos

Algas: *Scenedesmus subspicatus*.

Daphnias: *Daphnia magna.*

Peces: *Brachydanio rerio, Oryzias latipes.*

Lombrices de tierra (*Eisenia foetida*).

Insectos: *Musca vetustisima. Parasacophaga argyrostoma. Aphodius constans*.

7.3. Ensayos toxicológicos

Ensayo límite en el ratón (Up and Down).

Ensayo límite en la rata.

Ensayos según normativa ISO/EN 17.025.

7.4. Ensayos ecotoxicológicos

Ensayos para evaluar la toxicidad en el medio ambiente y ecosistema. Para su notificación y aceptación oficial, gubernamental o en la Unión Europea.

7.5. Ensayos de toxicidad en algas unicelulares de agua dulce

Evaluación del impacto ambiental o ecotóxico de una molécula biocida.

Efecto en el medio ambiente acuático en aguas superficiales y subterráneas.

Evaluación de la toxicidad de residuos de *biocidas*: abonos, estiércol, excrementos y purines. Otros: Industriales, urbanos y especiales.

Valoración de la toxicidad de sedimentos y lodos.

Desarrollo de criterios de calidad del agua. Protección de las aguas continentales.

Evaluación del riesgo para el ambiente y la salud humana.

7.6. Ensayos de toxicidad en lombriz de tierra

El ensayo de toxicidad se realiza sobre un indicador biológico del medio ambiente terrestre, *Eisenia foetida*, determinando los efectos de toxicidad agu-

da (mortalidad) originados por muestras contaminadas o productos químicos de diversa índole. Se evalúa la toxicidad de los productos en el suelo a través de dos tipos de ensayos:

a) Ensayo de toxicidad por contacto sobre papel de filtro: (Método OCDE 1984. Prueba nº207). La prueba consiste en exponer las lombrices de tierra en un papel de filtro húmedo a la disolución de la muestra, a diferentes concentraciones con el fin de determinar a las 48 horas la CL_{50}.

b) Ensayo de toxicidad en suelo artificial: (RD: 363/1995 Anexo 5 parte C12 "Toxicidad para Gusanos de tierra, Ensayo de Suelo Artificial").

El ensayo en suelo artificial permite investigar a corto plazo los efectos causados por las muestras a estudiar por absorción oral o cutánea de las mismas al exponer las lombrices de tierra, *Eisenia foetida*, a un suelo de composición definida. Se evalúa la mortalidad al 7º y 14º día después de la aplicación del compuesto, sustancia o mezcla y se determina la CL_{50}.

7.7. Ensayos de toxicidad aguda en Daphnia magna.

La *Daphnia magna* (Figura 2) es un crustáceo de agua dulce utilizado como bioindicador sensible y rápido de la contaminación del medio ambiente acuático, con el que se determina la toxicidad originada por productos de diversa naturaleza, como *biocidas*. Para ello se valora la movilidad, reproducción y mortalidad que se origina en estos crustáceos indicadores tras su exposición, continuada o no, a la muestra del *biocida* a evaluar durante diferentes tiempos según el objetivo o método. Frecuentemente se exponen durante 24 horas y 48 horas, y se establece la CL_{50}.

7.8. Ensayos de toxicidad aguda en peces

Determinación de la concentración letal 50% (CL_{50}) en condiciones definidas (procedimiento estático) de las concentraciones a las cuales un compuesto o sustancia es letal para el 50% de la población de ensayo en *Brachydanio rerio* (Figura 3), en periodo de exposición de 96 horas.

Calidad del agua: Determinación de la toxicidad letal aguda frente a un pez de agua dulce (*Brachydanio rerio*, Teleostei). Ensayo ISO 7346-1: 1996.



Figura 2. *Daphnia magna (Strauss).*



Figura 3. *Pez: Brachydanio rerio, pez de agua dulce.*

"Calidad del agua: Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna*, Strauss (Cladocera, Crustacea). Ensayo de toxicidad aguda". ISO 6341:1996/Cor.1:1998.

7.9. Ensayos físico-químicos

Son numerosos y diversos los ensayos físico-químicos aplicables a la diversidad de muestras, desde los *biocidas* puros a los de composición heterogénea. Para que la metodología aplicada conduzca a unos resultados claros y seguros que sean de aceptación internacional deben ser homologados y con garantía de calidad. Es decir, los métodos de ensayo acreditados por la "Entidad Nacional de Acreditación" de métodos de ensayo (ENAC), que en Es-

paña es la paralela a la universitaria ANECA. Los métodos disponibles frecuentemente aplicados en el laboratorio de ecotoxicología son la electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta resolución hasta la fecha, acoplada a espectrometría de masas en sus diferentes versiones y la espectrofotomería de absorción atómica también aplicando diversos accesorios específicos para los iones a cuantificar. Los *biocidas* pueden contaminar numerosas muestras que pueden contaminar campos agrícolas, sus cosechas, frutos y productos, los alimentos resultantes frescos, procesados o tratados: a) Aguas superficiales, subterráneas, residuales y lixiviados (pH, Biodegradación por respirometría, DQO). b) Aguas superficiales, subterráneas, residuales (conductividad, Sólidos sedimentables, Sólidos en suspensión, DBO5). c) Aguas superficiales, subterráneas, residuales, lixiviados y sustancias químicas solubles en las condiciones del ensayo (Ensayos de Toxicidad en *Daphnia magna, Scenedesmus subspicatus* y peces).

Los objetivos de una evaluación del impacto ambiental, consisten en la protección de la mayoría de las especies y mantener sus funciones fisiológicas y bioquímicas. Como se quiere explicar con los "alteradores endocrinos", ciertos niveles de sustancias tóxicas en agua de bebida y en los alimentos, impedirían esas funciones y afectarían a la continuidad de las especies. Los *biocidas* y otros compuestos pueden actuar sobre el sistema endocrino, inmune o nervioso de una forma específica, a través de receptores, o inhibición y activación enzimática a concentraciones mucho más bajas que las tóxicas. Este efecto específico es considerado como magnificación de los efectos. La mitigación de los efectos acaece cuando un agente tóxico, a través de un determinado mecanismo fisiológico o bioquímico, carece de la esperada toxicidad, como acaece en el caso de la inducción de la metalotioneína. Esta molécula es inducida por la presencia de cadmio y otros agentes tóxicos, los asocia a su molécula, y les hace menos tóxicos de lo que correspondería en la célula. Esta mitigación ocurre en los animales jóvenes que sintetizan más proteínas y con mayor rapidez que los ancianos (11). La evaluación de riesgos para la salud humana y para los ecosistemas, aunque parten de principios similares, precisan modelos conceptuales propios, establecidos por los autores y que son idóneos para recoger de forma adecuada el nivel de complejidad requerido (17).

8. CLASIFICACIÓN

Los *biocidas* más utilizados se clasifican por su naturaleza, en físicos, químicos y biológicos. Algunos otros agentes que se aplican para eliminar la su-

ciedad y como agentes de limpieza, para eliminar residuos de alimentos en superficies, aparatos, conducciones y utensilios, tienen también algunos de ellos propiedades bactericidas, entre los que cabe considerar ciertos detergentes y desinfectantes químicos.

8.1. Procedimientos físicos

La refrigeración evita la germinación de las esporas bacterianas de las especies mesófilas de *Bacillus* y *Clostridium*. El procesado térmico elimina el oxígeno del alimento lo que crea un ambiente anaerobio que impide su crecimiento. La velocidad de enfriamiento es efectiva frente a *Clostridium perfringens* cuya temperatura máxima de crecimiento es de 53,1 ºC a 41 ºC; al crecer dobla su número cada 7,2 minutos, siendo su temperatura mínima de crecimiento la de 20 ºC, y por debajo crece muy lentamente. La refrigeración es esencial para conservar los alimentos, antes y durante su distribución y consumo e incluso en el hogar a temperatura inferior a 5 ºC. La mayoría de especies de *Clostridium* no crecen por debajo de los 10 ºC ni tampoco germinan sus esporas. Sin embargo, *S. aureus* se multiplica a 6,1 ºC y produce toxinas a partir de 10 ºC de temperatura o superior. Sus toxinas son termoestables hasta la temperatura de 72 ºC. *Cl. botulinum* tipo E muere a los 82,2 ºC.

Los alimentos deben conservarse a menos de 3,3 ºC para garantizar su seguridad, evitar la germinación esporular y subsiguiente liberación de toxinas de *C. botulinum* del tipo E. Sus tipos A y B solo se multiplican y producen toxinas a temperaturas superiores a 10 ºC. Sin embargo, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* crecen a una temperatura mínima de 1 ºC por lo que los alimentos que no vayan a ser recalentados deben mantenerse muy poco tiempo en refrigeración y bajo un estricto control de temperatura (18). Con la congelación a temperaturas entre -18 y -24 ºC y en el caso del pescado crudo hasta cerca de -30 ºC, cesa toda actividad microbiana, si bien las moléculas enzimáticas conservan parcialmente su actividad.

Las radiaciones ionizantes y radiaciones U.V. han sido utilizadas ampliamente en la industria. Se trata de aplicar técnicas físicas, fuentes de radiación de alta energía (radiación UV) que son letales para los microorganismos, al oxidar su membrana o pared lipídica, desnaturalizar sus proteínas y generar radicales libres que provocan su muerte y destrucción inmediata (19, 20).

8.2. Compuestos químicos

Son sustancias orgánicas o inorgánicas bien conocidas, entre ellas: proteínas, como enzimas y lisozima. Otros como: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dióxido de cloro (ClO_2), e hipoclorito que se usan para desinfectar objetos en aseos (20-23); las isotiazolinas, cloraminas, bromuros de alquilo, cloruros de alquilo o arilo, fenoles, alcoholes, yodo, metales pesados, diversas sales de amonio cuaternario y anilidas son compuestos con efectos oxidantes, desnaturalizantes, desacoplantes, alquilantes y deshidratantes. En muchos de ellos se desconoce su mecanismo de acción celular y molecular (24).

Los primeros *biocidas* utilizados fueron compuestos fenólicos cuya actividad y eficacia fue contrastada con el fenol mismo como substancia de referencia y el método aplicado fue el "test de Rideal-Walker" todavía utilizado, aunque solo para compuestos fenólicos con las debidas correcciones según los ambientes de aplicación del *biocida* en cuestión. Las biguanidas se introdujeron hacia 1940 como agentes antimalaria y antivirales. El compuesto proguanil es inactivo pero su metabolito, dihidrotiazina, actúa sobre el agente responsable de la malaria *Plasmodium vivax* por ser antagonista de la enzima dihidrofolato reductasa. Aunque tuvieron poco uso hasta su evaluación antimicrobiana (25, 26), para su aplicación industrial se evaluó su actividad antibacteriana (27). La polihexametileno-biguanida (PHMB) es un polímero que mostró tener una elevada actividad antibacteriana (26) y junto con la clorhexidina son los compuestos más utilizados. El primero, PHMB, es utilizado para usos industriales mientras que la clorhexidina, poco tóxica para mamíferos, es aplicada para usos sanitarios en forma de gluconato, acetato y clorhidrato; su mecanismo de acción se estudió frente a los fosfolípidos de membrana; y también se emplea en usos industriales (27, 28), siendo el más frecuentemente utilizado el PHMB.

La Sociedad Alemana de Higiene y Microbiología ha establecido una batería de ensayos con el requerimiento de que cada *biocida* debe ensayarse estrictamente de acuerdo con el fin propuesto.

Otro de los compuestos químicos más utilizados como *biocida*, tanto para la industria alimentaria como en hospitales es el *peróxido de hidrógeno* al 35 % (v:v) en agua; a concentración muy baja, de 25 mg/L, impide el crecimiento de numerosas bacterias. A concentraciones más elevadas destruye las esporas bacterianas e implanta condiciones estériles seguras (29). Por ejemplo, a una concentración de H_2O_2 de 30 g/L y pH 6,5 en ensayos con esporas de *Bacillus subtilis* NCTC10452 a temperatura ambiente en el tiempo de partida 0 y con 1,9 x 10^5 esporas viables/mL, transcurridos 60 minutos se reducen a 300;

a los 180 min. sólo quedan 7,4; y a los 240 min. 0 esporas. Es preciso señalar que a la concentración, de 30 g/L de H_2O_2 se necesitan varias horas para alcanzar condiciones estériles (29). Otros compuestos con propiedades antimicrobianas similares son: perborato sódico; carbonato sódico y peroxihidrato; urea-peróxido de hidrógeno; agua-radiación UV-calor (19, 22, 30-32).

También se utilizan los *biocidas* como agentes conservantes. En la "sidra" se prefiere el ácido benzoico porque ejerce un efecto acidificante conservante y picante, y al formar parte de preparaciones que contienen nitrato, éste inhibe al *C. botulinum*. El ácido benzoico es un compuesto natural de arándanos y frutas similares y se adiciona a muchos alimentos; sus compuestos son más activos a pH ácidos e ineficaces a pH neutro, siendo más eficaz frente a mohos y levaduras que frente a bacterias. El dióxido de azufre es un inhibidor activo frente al desarrollo microbiano y se adiciona a embutidos, hortalizas deshidratadas y vino; mantiene además el color de los alimentos que van a procesarse. Las bacterias lácticas y las acéticas y muchos mohos son más sensibles al dióxido de azufre que las levaduras (31). La nisina es un polipéptido producido por bacterias lácticas (*Lactobacillus lactis*) de naturaleza antibiótica que inhibe el crecimiento de otras bacterias próximas. No se utiliza en numerosos países porque mantienen el criterio de que los antibióticos solo deben aplicarse para conservar la salud del hombre y de los animales.

9. APLICACIÓN DE BIOCIDAS

Los objetivos perseguidos con el uso de compuestos *biocidas*, detergentes y agentes desinfectantes químicos son la limpieza y la calidad de los productos, esenciales ambos para conservar una población sana en Salud Pública. La suciedad depende de la composición del alimento, de la naturaleza del proceso al que ha sido sometido y de los microorganismos detectados. Si se trata de suciedad sin contaminación microbiológica, generalmente se elimina con medios físicos, o con agua caliente suplementada con detergentes.

Para evitar contaminaciones microbiológicas, la limpieza debe ser rápida o inmediata después de acabado el procesado alimentario, antes de la desecación, desnaturalización y fijación a las superficies de los restos alimentarios, como proteínas, leche, grasas. El sumergido de las piezas pequeñas del equipo en agua caliente elimina restos alimentarios e impide el crecimiento bacteriano. En otro caso se usa el raspado y cepillado a 45 ºC. No deben utilizarse abrasivos, cepillos metálicos, ni estropajos de acero porque dañan las superficies y pueden pa-

sar a los alimentos partículas metálicas, además en los surcos microscópicos que se originan pueden estancarse restos alimentarios fuente de contaminaciones microbiológicas. También las erosiones de los metales y tuberías de plástico provocan retenciones de restos alimentarios y crecimiento bacteriano que debe eliminarse (33). Las bacterias se unen a estas zonas superficiales mediante fibrillas extracelulares y forman biopelículas que son difíciles de eliminar (34). Es importante el acabado y diseño de los aparatos para impedir la permanencia de residuos alimentarios. La aplicación de chorros de agua a gran presión y temperatura adecuada en caso de alimentos hidrosolubles es muy útil y práctica, lo mismo que la limpieza a vacío para alimentos secos y restos focales de suciedad, ya que los chorros de aire comprimido diseminan la suciedad por el entorno; también es adecuado para residuos persistentes y tenaces (31, 35).

9.1. Algunos detergentes con acción biocida

Muchos de los detergentes tienen propiedades bactericidas y son empleados como *biocidas*. Eliminan además muchos tipos de suciedad y bajo circunstancias distintas, por ello a un detergente ideal se le exigen múltiples propiedades que no vamos a mencionar aquí, aunque no se le exige ser bactericida o *biocida*, pero puede serlo. Estos compuestos pueden ser degradables por las bacterias del efluente, y su arrastre con la limpieza del detergente facilita también la desinfección posterior.

Entre los detergentes álcalis inorgánicos, la sosa cáustica (hidróxido sódico) es el más fuerte y barato de los compuestos, con propiedades disolventes y bactericida. Debe tenerse gran cuidado en su manejo por ser corrosivo para algunos metales y en especial para el aluminio, es aplicable en múltiples usos y deben utilizarse, gafas o anteojos, ropas y guantes especiales y careta o vitrina en función del objetivo y materiales a limpiar.

Los ácidos inorgánicos y orgánicos aunque tienen propiedades bactericidas, no son aplicables para dicho uso, pues son todos corrosivos (clorhídrico, sulfúrico y nítrico; fosfórico y sulfámico menos fuertes también se aplican esporádicamente) se aplican para tratamientos focales para eliminar precipitados en la industria de la leche y otros depósitos minerales; y además deben utilizarse caretas y ropas protectoras en los casos de aplicación. Los ácidos orgánicos con acción bacteriostática son más débiles que los inorgánicos y más seguros en su manejo. Los que se incorporan a las fórmulas de detergentes son: cítrico, glucónico, hidroxiacético y tartárico.

En la actualidad tienen una amplia aplicación los detergentes para limpieza y descontaminación, como los agentes de superficie activa, o surfactantes que disminuyen la tensión superficial. El jabón de sales potásicas o sódicas de ácidos grasos (saponificación) a partir de los ácidos esteárico, palmítico y oleico. Han sido sustituidos por agentes sintéticos: aniónicos, catiónicos, no iónicos, y anfotéricos en función de su carga eléctrica activa en disolución. Forman parte de fórmulas detergentes de limpieza, por ser emulsionantes, que ayudan eficazmente a la acción bactericida o *biocida* y son fácilmente arrastrados por el agua. Los agentes catiónicos se emplean como desinfectantes y esterilizantes, con acción bactericida, que veremos más adelante, mientras que los detergentes aniónicos y no iónicos tienen escaso efecto bactericida. El problema de la espuma se soslaya incorporando antiespumantes en las fórmulas de detergentes apropiados para la limpieza de la industria alimentaria.

Los agentes de superficie activa anfóteros que se utilizan como detergentes tienen actividad bactericida. Se presentan como aniónicos y catiónicos dependiendo del pH. Un ejemplo es la dodecil-diamino-etil-glicina que es un detergente aniónico. Los detergentes anfóteros tienen actividad bactericida.

Los agentes secuestrantes como el agua, que es el disolvente universal, carecen de poder bactericida aunque al facilitar la limpieza favorecen una posterior acción bactericida. Mientras disuelve las sales, el agua pierde su poder disolvente, volviéndose más dura, y precipitar las sales de calcio y magnesio que contiene. Entre los inorgánicos se utilizan diversos polifosfatos en agua (pirofosfato, tripolifosfato, tetrafosfato, hexametafosfato). Y entre los orgánicos, llamados también agentes quelantes, se aplican como los anteriores en forma de sales, el ácido etilén-diamino-tetra-acético, el ácido nitrilo-acético, el ácido glucónico y el heptónico (31).

Las fórmulas que se utilizan en la industria alimentaria como para otros usos, se presentan en forma de polvo o líquida. Cada superficie exige un tratamiento adecuado y tal vez específico, pero con una batería de fórmulas o productos es suficiente.

El aluminio es muy utilizado en la industria alimentaria y por ello deben emplearse agentes no corrosivos; para ello se añade a la fórmulación el metasilicato sódico con propiedades anticorrosivas. Se aplican diferentes tipos de formulas químicas (36). En todos los agentes secuestrantes y desinfectantes y para su eficacia, además de sus propiedades intrínsecas ya señaladas, son decisivas la temperatura, la concentración, las turbulencias y la velocidad del líquido en las tuberías; y por otra parte extrínseca, la solubilidad de los residuos a limpiar, secuestrar o eliminar.

9.2. Biocidas químicos (desinfectantes químicos)

Algunas industrias alimentarias necesitan en ocasiones, para su aparataje, tuberías y accesorios una limpieza pulcra y estéril absoluta. Sin embargo, en general el objetivo consiste en disminuir la presencia de microorganismos de forma que no influyan en la calidad microbiológica de los alimentos en contacto con las superficies del sistema de procesado industrial. Pueden sobrevivir algunas esporas bacterianas y tal vez formas vegetativas muy resistentes que no influyen en la calidad microbiológica de los productos, y por ello la palabra clave es desinfectar, porque el agente desinfectante tiene propiedades bactericidas y es considerado *biocida*. Cuanto más limpia esté una superficie de procesado de alimentos más rápida y eficaz será la posterior actuación del agente químico *biocida*. Se debe desinfectar inmediatamente antes de proceder a una elaboración de un alimento.

Con anterioridad hemos informado de las características de un biocida ideal. Agentes químicos con efecto sobre la salud y ecosistema, por ello no añadimos más características por estar suficientemente tratadas. Sin embargo, vamos a señalar algunos de los efectos para su aplicación industrial en la industria alimentaria.

Formulaciones que actúan por liberación de cloro. Entre los compuestos más utilizados en la industria alimentaria se encuentran los que liberan cloro, como los hipocloritos y sus sales (ácido hipocloroso HOCl; libera OCl^- ión bactericida). Menos utilizados son el cloro gaseoso y el fosfato trisódico clorado, las cloraminas orgánicas, derivados del ácido isocianúrico y la diclorodimetilhidantoina. Las bacterias Gram positivas y Gram negativas les son sensibles, igual que las esporas bacterianas. Se aplican a pH alto para prevenir los efectos de la corrosión aunque se pierda actividad *biocida*. Deben enjuagarse rápidamente para evitar los efectos corrosivos del cloro en las superficies. Los más usados son el hipoclorito sódico (NaOCl) con un 10-14% de cloro disponible y el hipoclorito cálcico, $Ca(OCl)_2$, en polvo con un 30% de cloro disponible. Todos son irritantes de la piel y ojos, y deben manejarse con cuidado, guardarse en recipientes opacos para resguardarse de la luz, y el pH al que tiene poder germicida óptimo es 4,5, pero también es máximo su poder corrosivo, por ello se aplican a un pH de 10 a 11, a baja temperatura y a una concentración de cloro disponible entre 50 y 200 ppm, y tiempos de contacto entre 3 y 30 minutos (31).

El cloro gaseoso tiene ciertos usos en la industria alimentaria, mediante su aplicación con un aparato clorador con flujo de velocidad constante. El nivel de cloro residual es de 1 a 5 ppm para la mayoría de los sistemas continuos de clo-

ración de la fábrica, como nebulizadores de cintas transportadoras y elevadoras; sin embargo, para la desinfección de la fábrica al terminar la jornada y para tratar el agua de refrigeración de latas se necesitan concentraciones mayores aproximadamente de 10 a 20 ppm. El dióxido de cloro (ClO_2) es más práctico y activo a pHs entre 3 y 13 y se ha popularizado en los sistemas de reciclado de agua en las fábricas de procesado de alimentos vegetales. El bromuro sódico (NaBr) que libera bromo, halógeno volátil, se adiciona a los productos *biocidas* químicos para aumentar el poder bactericida. Las cloraminas T, B y dicloramina T son más estables que los hipocloritos en presencia de materia orgánica pero menos irritantes, tóxicos y corrosivos, aún así deben enjuagarse las superficies tratadas después de su empleo, no obstante, su precio limita su comercialización y aplicación.

Las sales sódicas de los ácidos dicloro-isocianúrico y tricloro-isocianúrico se utilizan como bactericidas por tener niveles altos de cloro disponible, se comercializan en forma de polvo, pero como las cloraminas son caros pero mantienen un rango de pH bactericida más amplio entre 6 y 10. La dicloro-dimetil-hidantoina de grado técnico, se utiliza en polvo de pureza del 25% con una disponibilidad de liberación del 16% de cloro, con gran poder bactericida a pHs ácidos.

Entre las sales de amonio cuaternario cuyo grupo iónico $(NH_4)^+$ en el que se ha sustituido uno o más átomos por restos alquilo o arilo, y el anión es un grupo cloruro o bromuro, la parte activa de la molécula es el catión, mientras que la actividad del anión depende la solubilidad. Los agentes más utilizados son el bromuro de cetiltrimetil-amonio y el cloruro de laurildimetilbencil-amonio, siendo los más bactericidas los que tienen como radical una cadena alquílica entre 8 y 18 átomos de carbono. Todos son *biocidas* muy activos frente a bacterias Gram positivas, menos frente a las Gram negativas, salvo si van acompañados de agentes secuestrantes. Su poder bactericida disminuye a pHs inferiores a 5. No son corrosivos, ni irritantes de la piel y ojos y su manejo es seguro, salvo a grandes concentraciones. Como surfactantes catiónicos tienen poder detergente. Debe tenerse bien presente que las mezclas de ciertos productos puede llevar a la precipitación por incompatibilidades entre moléculas y a la pérdida de actividad. Habitualmente suelen utilizarse a concentraciones entre 50 y 500 ppm, con temperaturas mayores de 40 ºC y con tiempos de contacto que varían entre 1 y 30 minutos. Finalmente, las biguanidas son otro tipo de desinfectantes catiónicos que se emplean a pequeña escala con la ventaja de ser muy activos frente a bacterias Gram negativas, y de no producir espuma y de no afectarles las aguas duras (31).

Los yodóforos son formulaciones que llevan yodo que actúa de *biocida* o bactericida. En su composición participa un surfactante no iónico, aunque pueden emplearse también los aniónicos y los catiónicos. No son corrosivos, ni irritantes, ni tóxicos y por su color hay que enjuagar bien después de su empleo. Si la concentración de surfactante es grande actúan como detergentes, desinfectantes y *biocidas*; a concentraciones menores de surfactante actúan como bactericida. Son más estables que los compuestos de amonio cuaternario, aunque se les añade ácido fosfórico para rebajar el pH de la disolución, ya que son más activos en el rango de pH de 3 a 5, en cuyo intervalo el ácido fosfórico actúa como tampón. El yodo, como el cloro, es también un halógeno, pero frente a las esporas, los hipocloritos son más activos que los yodóforos. Los materiales plásticos, gomas y otros objetos absorben el color del producto, por ello se debe evitar su contacto con alimentos. Se aplican mucho en la industria láctea por el poder bactericida del yodo, y de disolvente del ácido fosfórico lo que impide la formación de la piedra de la leche y de concreciones cálcicas. La industria cervecera aplica también yodóforos a temperaturas de trabajo de 50 ºC y concentraciones de yodo entre 10 y 100 ppm.

Los surfactantes anfóteros tienen escaso poder bactericida o *biocida*, son principalmente detergentes y sin embargo, los derivados de imidazolina son *biocidas* relativamente potentes y además detergentes débiles. El ácido etil-beta-oxipropiónico-imidazolina, es un anfótero que actúa como aniónico o catiónico en función del pH de la disolución y es precisamente la forma catiónica la que actúa de potente *biocida*. Les afecta poco la presencia de materia orgánica y la dureza del agua, no son corrosivos, ni tóxicos y son estables mucho tiempo. Por su elevado precio y no muy elevada actividad son poco empleados en la industria alimentaria (31).

Los compuestos fenólicos son potentes *biocidas*, con amplia acción bactericida, no se usan en la industria alimentaria por su fuerte olor y su posible transmisión a los alimentos.

Detergentes-desinfectantes, conocidos como detergentes antimicrobianos, son formulaciones estables con diversos componentes compatibles que complementan la limpieza y desinfección por su potente acción bactericida o *biocida*. Las mezclas no son sinérgicas, ya que cada ingrediente por separado tiene mayor actividad. Se emplean cada vez más en la industria alimentaria por su fácil aplicación y ahorro de tiempo, una sola operación sirve de limpieza y desinfección. La alternancia en la aplicación de diversas formulaciones tiene la ventaja de eliminar resistencias y diversos tipos de residuos alimentarios.

Otros métodos que utilizan *biocidas*. Antes de la aplicación del agente biocida se utilizan agentes de limpieza como: calor (vapor, agua caliente), lim-

pieza en seco (limpiadoras a vacío), limpieza *in situ* o sistemas CIP y nebulizadores. Anteriormente se comentaron en el texto otros métodos de limpieza, entre ellos la utilización de espuma, que se aplica en paredes, suelos, zonas inaccesibles, vehículos y utillaje en contacto con los alimentos. Se trata de utilizar las propiedades adhesivas de la espuma, mediante un agente bactericida con otro espumante, compatibles en la fórmula química, aún en superficies verticales si hay suciedad a la que se adhiere. Después de unos 20 minutos de actuar la espuma se procede al enjuagado con agua a la que se añade otro agente bactericida o *biocida*. Suele aplicarse en las industrias de desecación de alimentos. En ocasiones se aplican geles en vez de espumantes y en el enjuague pueden aplicarse los mismos bactericidas que en el caso de los espumantes (37).

10. PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EVALUAR EL EFECTO BIOCIDA

Mencionamos anteriormente la prueba de Rideal-Walker para evaluar la actividad biocida de un compuesto, preparado o formulación. Se mide la velocidad de destrucción de las bacterias seleccionadas o de otros microorganismos en condiciones pre-establecidas, aunque no son obligatorias (31).

1. Prueba de Rideal-Walker. Se utilizó por primera vez en 1903 y hoy aun se aplica como la describe la British Standard 541 (1934) (38) en la que el agente bactericida problema se compara con la referencia estándar del fenol, y la actividad antimicrobiana se expresa en coeficientes de fenol. La capacidad bactericida de diluciones del desinfectante problema se compara con la de diluciones específicas de fenol, utilizando como estándar un cultivo de 24 horas de un microorganismo (*Salmonella typhi*) con la existencia o ausencia de crecimiento microbiano. Para la industria alimentaria es efectiva la prueba si se aplica el abanico de microorganismos encontrados en las líneas de procesado (39).
2. Prueba de Chick-Martin empleada por primera vez en 1908, está recogida en la British Standard 808, 1938 (40), se diferencia de la de Riedel-Walker porque se le añade como materia orgánica una suspensión de levadura estéril, para dar una concentración final de suciedad o residuo orgánico en la mezcla de 2,5%. Otra diferencia es que el tiempo de contacto es solo de 30 minutos y para su desarrollo o realización consultar citas señaladas y (31).

3. Prueba de Kelsey-Sykes. Las pruebas anteriores utilizan el coeficiente del fenol, y se basan en comparar el efecto del fenol con el compuesto desinfectante bactericida problema sobre el crecimiento de *S. typhi*. Para que la prueba sea rigurosa y fiable, es necesario un mayor rango de microorganismos. Kelsey y Sykes (1969) mejoraron estas pruebas del fenol (41), para evaluar desinfectantes frente a cuatro microorganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris* y pueden introducirse en la técnica otros microorganismos, levaduras y mohos, para averiguar cual de ellos es el más resistente al nuevo preparado o desinfectante. Para su realización consultar (41, 42). A pesar de las críticas ha sido adoptada por numerosos organismos oficiales en todo el mundo, cualquiera sea el tipo de *biocida* y su empleo (39).
4. Prueba de suspensión europea. Los estados europeos aplican diferentes pruebas para evaluar *biocidas* que se han intentado unificar y armonizar y se aprobó la "prueba de suspensión europea" (EST) del Consejo de Europa, 1987 (43). Esta prueba establece la actividad de los desinfectantes y *biocidas* a la concentración mínima recomendada por el fabricante frente a cinco microorganismos experimentales: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Como suciedad se utiliza tierra orgánica a dos concentraciones; una a 0,03% que representa las condiciones limpias y otra al 1% a condiciones sucias; se adiciona albúmina bovina y se realiza a 20 ºC, utlilizando un recuento final de 10^8 bacterias/mL (10^7 para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*), después de 2 minutos de contacto se adiciona a una de las suspensiones el desinfectante bactericida o *biocida,* y a la otra agua estandarizada que hace de control y se sigue la técnica según prescripción del Consejo de Europa, 1987. Debe realizarse en dos días distintos.
5. Prueba de superficie. Se emplean superficies de acero inoxidable o de vidrio, en las que se coloca una fina película de microorganismos con o sin materia orgánica, desecada al aire, sobre la que actúa el *biocida* o desinfectante. Este método se aplica en algunas industrias alimentarias (44).

11. APLICACIÓN DEL BIOCIDA IDEAL

Es muy importante para un buen control de limpieza identificar el posible tipo de microorganismo detectado, para aplicar así el *biocida* específico. Para

un control rápido, práctico y eficaz se dispone de: a) control visual; b) prueba de bioluminiscencia del ATP; y c) el control microbiológico.

11.1. Inspección visual

Es un método simple pero incierto ya que no establece el grado de limpieza microbiológica alcanzado. Las inspecciones se realizarán durante o inmediatamente después de terminada la limpieza y se realizarán aleatoriamente; depende mucho de la meticulosidad del inspector, cuya experiencia le permite detectar las señales de una limpieza ineficaz, aunque no ocurra así en todos los casos (por ejemplo, a veces, no se aprecian a simple vista los restos alimentarios si en una superficie limpia hay una fina capa de agua cubriéndola). Las superficies se observan mejor si se iluminan con una potente fuente luminosa. Se llevará un libro registro donde se anotarán los materiales de limpieza usados, las diluciones, sus mezclas y los tiempos de aplicación. Lo conservará la Empresa con los informes sucesivos del inspector (45).

11.2. Prueba de luminiscencia del ATP y los cultivos microbiológicos

Solo comentaremos de pasada la prueba de bioluminiscencia, pues los cultivos microbiológicos se estudian en otro capítulo. Además de detectar el material microbiano detecta los residuos alimentarios. Las moléculas de ATP (adenosintrifosfato) se hallan en todas las células vivas procarióticas y eucarióticas; y el ATP se detecta rápidamente por la emisión de luz, al combinarse con la enzima luciferasa y se mide en el luminómetro (46, 47). El límite de detección es de 1 picogramo de ATP, lo que equivale aproximadamente a 1.000 células bacterianas y la técnica se realiza en pocos minutos y permite tomar medidas correctoras de inmediato. La estimación se refiere al número total, que es la guía más sensible del estado de limpieza. Como los microorganismos se distribuyen irregularmente por las superficies de los equipos, se muestrea un área tan extensa como sea posible y principalmente los puntos más inaccesibles (como los drenajes), con una torunda de algodón estéril y se lava bien con un volumen conocido de diluyente o se usa el método de contacto con agar. Se trata de un método lento porque hasta transcurridas 48 horas no se dispone de los resultados. Por ello el método de bioluminiscencia del ATP tiene mayor aplicación y merecido prestigio en la industria alimentaria.

Para aplicar el *biocida* ideal podemos servirnos también del análisis de los propios alimentos procesados que antes contactan con las superficies limpias, por ser los primeros que se cargan con las bacterias residuales, enjuagado y cuya identificación nos facilitará tomar medidas en los próximos sistemas de lavado, de acuerdo con arrastre y decidir el *biocida* ideal a aplicar, el tipo de proceso y naturaleza del alimento. Si se trata de alimentos líquidos se toman muestras a tiempos regulares de tiempo desde el inicio del procesado.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Anónimo (1979) Hydrogen peroxide solves bulking problem at Coors waste treatment plant. *Food Eng*. 230.
2. Stringer, M. F. (1993) Safety and quality management through HACCP and ISO 9000. *J. Food Protect*. **56:** 904.
3. Bergey Manual. The Bergey Manual Trust. (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7th edition. Edited by Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E. The Willliams and Wilkins Company. p. 418.
4. Singleton, S. & Sainsbury, D. (1978) *Dictionary of Microbiology*. 1st edit., John Wiley & Sons Limited, Chichester.
5. Snyder, O. P. (Jr.) (1995) HACCP-TQM for retail and food Service operations. En: *Advances in meat Research*. Volume 10. HACCP in Meat, Poultry and Fish Processing. Edts: Pearson, A. M. & Dutson, T. R. London, Blackie Academic & Professional.
6. Forsythe, S. J. & Hayes, P. R. (1999) *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP.* Higiene de los Alimentos, Microbiología y HACCP. 2ª edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA.
7. Meitz, A. (1991) Nr: 306. *Corrosión 91. Nr. 306*.
8. Cartwright, N., Fawell, J., Zabel, T. & Pugh, M. (1999) Industrial Chemicals: Burden of the past, challenge for the future. *European Union, Report EU 4719*.
9. Johnston, R. K., Munns, W. W. R. Jr., Tyler, P. L., Marajh-Whittemoore, P. Finkelstein, K., Munney, K., Short, F. T., Melville, A. & Hahn, S. P. (2002) Weighing the evidence of ecological risk from chemical contamination in the estuarine environmental adjacent to the Portsmouth Naval Shipyard, Kittery, Maine, USA. *Environ. Toxicol. Chem*. **21:** 182-194.
10. NRC (1983) *Issues in risk assessment*. National Academy Press, Washington D. C.

11. Ribas Ozonas, B. (2004) In: Elements and their Compounds in the Environment. Merian, M. E., Anke, M., Ihnat, M. & Stoeppler, M. (Eds.). *Metallothioneins*. Vol. 1, Chapter 6. (pp. 391-400). Editorial: Wiley-VCH, Germany.

12. González Barón, M. & Casado Sáenz, E. (1997) En: *Cáncer y Medio Ambiente*. Editorial NOESIS, Madrid.

13. Ribas Ozonas, B. (1998) Evaluación toxicológica y ecotoxicológica de residuos y vertidos. En: Los residuos y sus riesgos para la salud. (Jimenez Gómez, S. edt.). Monografía V. Real Academia Nacional de Farmacia. (pp. 379-438). Realigraf, S. A., Madrid.

14. Ribas Ozonas, B. (2003) Desfoliantes: Agente naranja. Otros agresivos químicos y su control. *An. R. Acad. Farm*. 431-450.

15. Bartell, S. M., Gardner, R. H. & O'Neill, R. V. (1992) *Ecological risk estimations*. Lewis Publishers, Boca Raton. USA.

16. Pate-Cornell, E. (2002) Risk and uncertainty analysis in government safety decisions. *Risk Anal*. **22:** 633-643.

17. Pugh, D. M. & Tarazona, J. V. Editors (1998) Regulation for chemical safety in Europe: Analysis, comment and criticism. *Environment and Policy Series*, volume 15, (pp. 210) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London.

18. Notermans, S., Gallhof, G., Zwietering, M. H. & Mead, G. C. (1995) The HACCP concept: Specification of criteria using quantitative risk assessment. *Food Microbiology.* (London). **12:** 81-90.

19. Bayliss, C. E. & Waites, W. M. (1979) The synergistic killing of spores of Bacillus subtilis by hydrogen peroxide and ultraviolet light irradiation. *FEMS Microbiol. Lett*. **5:** 331.

20. Colobert, I., Montaenou, B., Nofre, C. & Cier, A. (1962) Effect microbiocide sur *E. coli* de systèmes cliniques générateurs du radical libre hydroxyle. *Ann. Inst. Pasteur.* **8:** 278.

21. Tebbutt, G. M. (1984) A microbiological study of various food premises with an assessment of cleaning and disinfection practices. *J. Hygiene*. Cambridge, **92:** 365-375.

22. Baldry, M. G. C. & Fraser, J. A. L. (1988) Disinfection with peroxygens. In: Industrial Biocides. (Payne, K. R., eds.). *Critical Reports on Applied Chemistry.* Chapter 6. Vol. **23:** 91-116.

23. Cole, C. A., Ochs, L. D. & Funnel, F. C. (1974) Hydrogen peroxide as a supplemetal oxygen source. *J. Water Pollut. Control Fed*. **46 (11):** 2579.

24. Hamilton, W. A. (1970) Mode of action of membrane active antibacterials. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Symp*. **20:** 71-79.

25. Davies, G. E., Francis, J., Martin, A. R., Rose, F. L. & Swain, G. (1954) 1:6-dichlorophenyldiguanidohexane (Hibitane) laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br. J. Pharmacol*. **9:** 192-196.

26. Rose, F. L. (1983) The chemistry of an antiseptic. *Br. J. Clin. Pract*. 25, Suppl.: 5-9.

27. Woodcock, P. M. (1988) Biguanides as industrial biocides. (Payne, K. R. edt.) Industrial biocides. *Critical Reports on Applied Chemistry*. Vol 23. John Wiley & Sons. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. Pag. 19-36.

28. Broxton, P., Woodcock, P. M., Heatley, D. & Gilbert, P. (1984) Interaction of some polyhexamethylenebiguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Appl. Bact*. **57:** 115-124.

29. Gould, G. W. & Hitchins, A. D. (1963) Sensitisation of bacterial spores to lysosome and to hydrogen peroxide with agents that cause rupture disulphide bonds. *J. Gen. Microbiol*. **33:** 413.

30. Yeshpe-Puter, M. S. & Eylan, E. (1968) Disinfection of water by hydrogen peroxide. *Health Lab. Sci*. **5 (4):** 233.

31. Forsythe, S. J. & Hayes, P. R. (1999) Limpieza y desinfección: métodos. Capítulo 9. (pp. 359-398) En: *Higiene de los Alimentos, Microbiología y HACCP*. 2ª edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA.

32. Payne, K. R. (edt.) (1988) Industrial biocides. *Critical Reports on Applied Chemistry*. Vol 23. John Wiley & Sons. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.

33. Holah, J. T. & Thorpe, R. H. (1990) Cleanability in relation to bacterial retention an unused and abraded domestic sink materials. *J. Appl. Bacteriol*. **69:** 599-608.

34. Schwach, T. S. & Zottola, E. A. (1984) Scanning electron microscopic study and some effects of sodium hypochlrorite on attachment of bacteria to stainless steel. *J. Food Protect*. **47:** 756-759.

35. Forsythe, S. J. & Hayes, P. R. (1999) *HACCP y calidad del producto*. Capítulo 8. pp. 303-358. En: Higiene de los Alimentos, Microbiología y HACCP. 2ª edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA.

36. Tamplin, T. C. (1980) CIP technology, detergents and sanitizers. In: *Hygienic design and Operation of Food Plant*. Ed: Jowitt, R. Chichester. Ellis Horwood.

37. Forsythe, S. J. & Hayes, P. R. (1999) *Limpieza y desinfección: aplicaciones prácticas*. Capítulo 10. pp. 399-406. En: Higiene de los Alimentos, Microbiología y

HACCP. 2ª edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA.

38. British Standard 541 (1934) *Technique for determining the Rideal-Walker coefficient of disinfectants*. London. British Standards Institution. U.K.

39. Croshaw, B. (1981) Disinfectant testing with particular reference to the Rideal-Walker and KelseySykes tests. In: *Disinfectants. Their use and evaluation of effectiveness*. Eds. Collins, C. H., Allwood, M. C., Bloomfield, S. F. & Fox, A. London. Academic Press. U.K.

40. British Standard 808 (1938) *Modified technique of the Chick-Martin test for disinfectants*. London. British Standards Institution. U.K.

41. Kelsey, J. C. & Sykes, G. (1969) A new test for assessment of disinfectants with particular reference to their use in hospitals. *Pharmaceutical J*. **202:** 607-609.

42. Kelsey, J. C. & Maurer, L. M. (1974) An improved (1974) Kelsey-Sykes test for disinfectants. *Pharmaceutical J*. **213:** 528-530.

43. Consejo de Europa. Council of Europa (1987) Test Methods for the antimicrobial activity of disinfectants in food hygiene. Strassbourg. *Council of Europa Publication*.

44. Blood, R. M., Abbiss, J. S. & Jarvis, B. (1981) Assessment of two methods for testing disinfectants and sanitizers for use in the meat processing industry. En: *Disinfectants: Their use and evaluation of effectiveness*. Eds: Collins, C. H., Allwood, M. C., Bloomfield, S. F. & Fox, A. London. Academic Press. U.K.

45. Kulkarni, S. M., Maxcy, R. B. & Arnold, R. G. (1975) Evaluation of soil deposition and removal processes. An interpretative review. *J. Dairy Sci*. **58:** 1922-1936.

46. Stanley, P. E. (1989) A concise beginner's guide to rapid microbiology using adenosine triphosphate (ATP) and luminescence. En: *ATP Luminescence*. Eds.: Stanley, P. E., McCarthy, B. J. & Smither, R. Society for Applied Bacteriology, SAB Technical Series, Number 26. Oxford, Blackwell Scientific Publication.

47. Stanley, P. E. (1992) A Survey of more than 90 commercially available luminometers and imaging devices for low-light measurements of chemiluminescence and bioluminescence, including instruments for manual, automatic and specialised operation, for HPLC, LC, GLC and microtitre plates. Part I. Descriptions. *J. Biolumin. Chemilumin*. **7:** 77-108.

5. Las biopelículas microbianas, un búnker de uso habitual

CARMEN SAN JOSÉ Y BELÉN ORGAZ

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

1. LAS BIOPELÍCULAS NO SON UNA SUCIEDAD CUALQUIERA

Todos los días nos lavamos los dientes. Una operación rutinaria para hacer frente a la biopelícula (o *biofilm* en inglés) microbiana que nos es más familiar: la placa dental. Se forman biofilms cuando los microorganismos crecen agregados en algún tipo de interfase, sólido-líquido, sólido-aire, líquido-aire o entre líquidos inmiscibles, unidos por material extracelular propio, siempre que haya materia orgánica y humedad suficientes (1, 2).

Prácticamente todos los microorganismos ensayados son capaces de formar biofilms, a más o menos velocidad. Los más conocidos son los biofilms bacterianos y los que se forman sobre superficies sólidas: minerales, metálicas, poliméricas y por supuesto orgánicas. Puede tratarse de tejidos más o menos funcionales o sus residuos, de restos no estructurados de alimentos procesados o, por ejemplo, de compuestos volatilizados (procedentes de una combustión o una fritura) y luego solidificados sobre una superficie inerte, como la pared de una cocina. Pueden pues encontrarse depósitos de suciedad no estructurada (incluyendo o no microorganismos) por debajo o por encima de un biofilm.

A nivel doméstico, las cocinas y los baños son los lugares preferidos por los biofilms. No es casual que para estos sitios, las rutinas higiénicas tradicionales estén basadas en procedimientos mecánicos, ayudados por el calor, los detergentes y desinfectantes. Como en el caso de la placa dental, enjuagar o aclarar solo sirven para desplazar la materia orgánica recién depositada.

Aunque desde el punto de vista de la seguridad alimentaria interesan los microorganismos adheridos relacionados con algún eslabón de la cadena alimentaria, una buena parte de los conocimientos que se aplican para su control proceden de estudios básicos y médicos. Se ha estimado que en el 80% de las infecciones hay biofilms implicados (3-6).

2. UNA MATRIZ ADHESIVA

La tenacidad con que los biofilms se aferran a las superficies, es la propiedad que dificulta su limpieza. Se debe a que las células producen al fijarse materiales extracelulares (Polymeric Extracellular Substances, EPS) que con el agua (90-95%) forman pastas o geles muy adhesivos, lo que se llama glicocalix o matriz (7). Es lo que engloba y agrega a las células y las fija a la superficie o sustrato. En un principio se pensó que la trama de la matriz estaba constituida por un único polisacárido. Luego se ha ido viendo que, aparte de uno o varios tipos de polisacárido, en la matriz suele haber proteínas, DNA y lípidos. Entre los componentes puede haber productos específicos y también detritus, incluyendo restos de células muertas y moléculas o partículas atrapadas del medio exterior. Se cree que la matriz tiene fundamentalmente una misión protectora, pero algunos componentes pueden en ocasiones servir como alimento a organismos residentes. La firmeza de la adhesión está relacionada con la velocidad, dirección y turbulencia del flujo en contacto (8).

3. EL ASENTAMIENTO

La fijación e inmovilización es el efecto fundamental del biofilm: las células dejan de ser móviles y errantes, para hacerse sedentarias. El paso del modo de vida planctónico al modo sésil conlleva cambios fenotípicos importantes y una interacción cambiante entre el entorno y la expresión génica (9-12). La primera etapa de esa transición tiene lugar tras el acercamiento, pasivo o por quemotaxis, a la superficie. Es la retención por fuerzas débiles, electrostáticas, de Van der Waals o de interacción hidrofóbica. Una fijación tenue e inestable, que puede ser revertida por las fuerzas de cizalla del flujo tangencial y es por tanto más fácil de mantener en lugares protegidos, poco afectados por el flujo, como rincones, ángulos, resquicios, grietas, poros o microalteraciones del relieve de la superficie, como los arañazos o surcos causados por el roce o el empleo de productos abrasivos de limpieza (Figura 1).

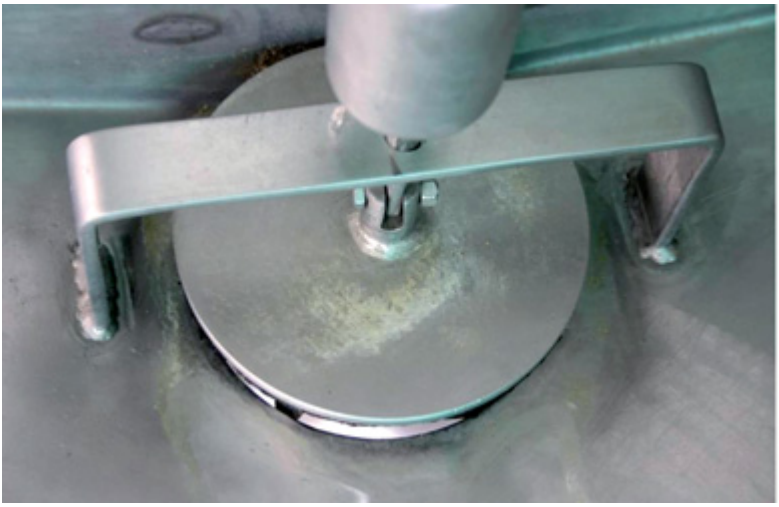


Figura 1. *Restos visibles de biofilms microbianos en el desagüe de un tanque de recepción de leche cruda en una quesería.*

La proximidad a la superficie parece ser detectada por las células, presumiblemente como modificaciones de las pautas de difusión. En esa situación, en combinación con otros factores del entorno relacionados con la densidad celular existente y las condiciones de crecimiento, se activa una especie de interruptor de la regulación, al elevarse el nivel intracelular de ácido 3',5' —ciclo— diguanílico (c-di-GMP) (13).

La densidad celular de la propia especie es percibida por las células microbianas mediante señales difusibles, llamadas autoinductores, que cada célula genera y cuya concentración externa es capaz de detectar. Al alcanzar estas señales un determinado nivel, se activa la expresión génica de diversas aptitudes, como la transferencia de plásmidos conjugativos, la esporulación, la síntesis de péptidos antimicrobianos o la formación de biofilms. A este fenómeno se le llama de Quorum Sensing (QS) (14). Los autoinductores mas conocidos son las acil-homoserín lactonas (AHL) de las bacterias Gram- y determinados péptidos modificados, de las Gram +. Se conocen además señales distinguibles por especies muy distintas y además, sistemas defensivos que obstaculizan o bloquean este tipo de comunicación entre células. Su explotación parece una herramienta prometedora para controlar diversas consecuencias del crecimiento microbiano, en las infecciones y por supuesto en alimentos (15-18).

En la segunda etapa del proceso de formación de biofilms, las células pierden sus apéndices de motilidad (flagelos y otros) y activamente comienzan a afianzar su anclaje produciendo polisacáridos adherentes. Continúa la multiplicación de células en el sitio. Cuando hay varias capas, en los habitantes de las inferiores se implanta un metabolismo parcialmente anaerobio y se hace más lenta la velocidad de multiplicación. El momento en que la fijación deja de ser reversible, o sea, en que el biofilm garantiza la persistencia en el sitio, depende de la velocidad de secreción de EPS, de las características del flujo en contacto y de la agresividad y eficacia de los sistemas antibiofilm, naturales o artificiales, actuando en cada caso.

En una tercera etapa, ya de madurez, la matriz adquiere mayor grosor y complejidad. Aparece lo que se denomina arquitectura, esto es, una organización tridimensional, con huecos o canales interiores por donde circulan el agua y partículas de pequeño tamaño. La imagen más conocida de biofilms maduros, tomada por microscopía confocal, recuerda a un campo de setas (Figura 2 y http://www.erc.montana.edu/CBEssentials-SW/bf-basics-99/default.htm) donde hay huecos y una importante heterogeneidad de ubicaciones para las células alojadas. Esta forma de organización o diferenciación supera en complejidad lo que antes se suponía era posible en procariotas (2), pero a diferencia de lo que ocurre en formas pluricelulares, es reversible. Las células de los biofilms pueden desprenderse o desagregarse y volver a la vida planctónica.

El desprendimiento puede ser considerado como una etapa más del ciclo de vida del biofilm, a la que se puede llegar o no en función de las condiciones ambientales (5). Las células desprendidas serían como pioneros que buscan un nuevo lugar para colonizar. En los cultivos en batch, por ejemplo, se observa un desprendimiento importante, aunque no completo, al llegar a la fase estacionaria. Hay que recordar, no obstante que a lo largo del desarrollo de los biofilms y durante su mantenimiento, pueden seguir coexistiendo en el medio de cultivo células planctónicas, en mayor o menor proporción, según el organismo y el sistema de cultivo, continuo o discontinuo. La fisiología del desprendimiento está siendo estudiada con mucho interés, porque ese es el paso que determina la transferencia, esto es la incorporación de células sueltas (del patógeno o del organismo causante de deterioro) al alimento, que puede haber sido ya higienizado (19). O al torrente circulatorio en el caso de un biofilm sobre un implante, por ejemplo. También puede también producirse desprendimiento, obviamente, por el uso de procedimientos de limpieza mecánicos.

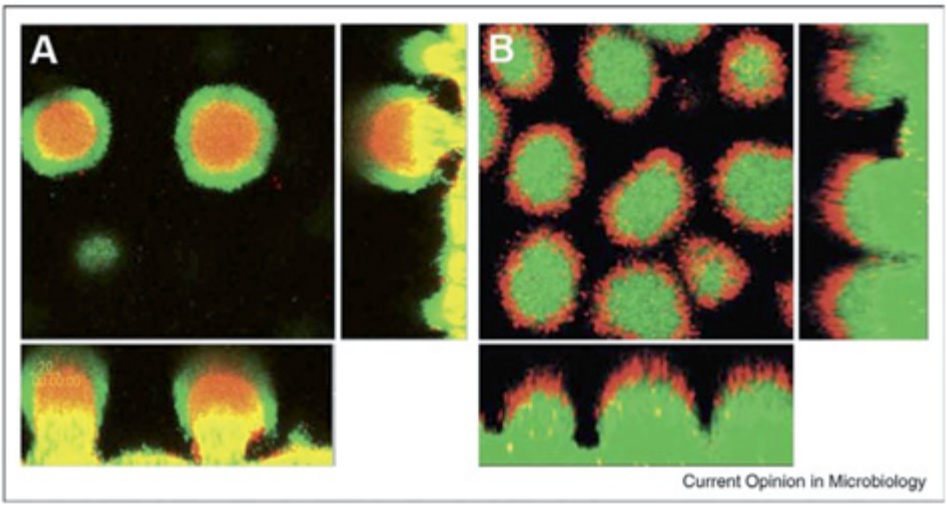


Figura 2. *Muerte por tratamiento antimicrobiano de distintas subpoblaciones en biofilms de P. aeruginosa. Biofilms de 4 dias de edad de una cepa de P. aeruginosa PAO1 marcada con Gfp (proteína verde fluorescente) cultivados en medio de glucosa, fueron tratados con EDTA (**A**) o tetraciclina (**B**) y después teñidos con ioduro de propidio para obtener imágenes por microscopía confocal (CSLM). Las células vivas presentan color verde y las muertas, rojo o amarillo. Las imágenes centrales muestran secciones horizontales y las de los lados, secciones ópticas verticales. La barra equivale a 20* μm. *Reproducido a partir de Parsek y Tolker-Nielsen (11) con permiso de Elsevier.*

4. UN MODO DE VIDA PROTEGIDO, LENTO Y CON ESPECIALIDADES

La matriz de los biofilms impone a los solutos una velocidad de difusión más lenta que la existente en el medio líquido y eso determina que dentro de ellos existan gradientes de concentración de oxígeno, nutrientes, etc., entre las zonas superficiales, en contacto directo con el medio y las profundas. La difusión, a parte de por la densidad de la trama de la matriz en conjunto, se ve afectada particularmente por la carga de los polisacáridos, que suelen contener bastante proporción de ácidos urónicos. La matriz se comporta pues como barrera y amortigua la brusquedad de los cambios que puedan tener lugar en el medio exterior (7). Se pueden pues considerar los biofilms como formas de resistencia o protección frente a la desecación, las oscilaciones en disponibilidad de nutrientes y la presencia de agentes antimicrobianos (1), fagocitos y protozoos (20).

Por otra parte y frente a la homogeneidad de condiciones entre las células planctónicas, en los biofilms se pueden pues encontrar una gran heterogenei-

dad de micronichos: desde zonas bien aireadas y nutridas pero más expuestas a condiciones o agentes adversos, hasta otras alejadas, aisladas, muy escasamente nutridas y drenadas, con un metabolismo lento y fundamentalmente anaerobio, que se multiplican a muy baja velocidad o están prácticamente durmientes (10, 12).

La diversidad de micronichos induce la manifestación de diversos fenotipos (11) y a la larga, parece propiciar también la aparición de distintos genotipos, a partir de una misma población inicial. Se cree que con el tiempo van surgiendo subpoblaciones con distintos genes "contingentes", genes que no son operativos mientras no se produce una contingencia, esto es, una eventualidad que su activación permite superar. Puede tratarse de la aparición de un nuevo producto tóxico o un nuevo sustrato, o la desaparición de un nutriente hasta ese momento habitual. A los individuos de las subpoblaciones que en determinadas condiciones se convierten en únicos supervivientes, se les llama "persistores" (18). Han sido caracterizados varios casos por exposición a biocidas; véanse por ejemplo los puntos aislados de distinto color en la Figura 2. La distribución de los genes contingentes en distintas subpoblaciones de la misma especie es la base del concepto de un "genoma distribuido", que amplía considerablemente las posibilidades de supervivencia de la población original.

Los tres factores citados, esto es, la función barrera de la matriz, la baja velocidad de multiplicación (ofreciendo menos dianas para la acción de los agentes antimicrobianos) y la generación de persistores, son los mecanismos que parecen sustentar la mayor resistencia de las células en los biofilms, en comparación con las correspondientes células planctónicas (3, 21, 22).

5. UN BÚNKER DE USO HABITUAL

Si la firmeza de la adhesión de los biofilms obstaculiza su limpieza, la baja susceptibilidad de sus células a los biocidas hace muy difícil su desinfección. Las concentraciones de biocidas requeridas para destruir las células sésiles suelen ser 10-1.000 veces mayores que las que se necesitan para matar las células planctónicas (3, 23-25).

Conviene recordar que hasta hace poco, la microbiología que se practicaba en los laboratorios se hacía solo con células planctónicas. Células en suspensión, en cultivos monoespecie, con medios muy ricos en nutrientes y con todo tipo de facilidades para el crecimiento. Sin embargo, en la realidad esas condiciones tan favorables no son frecuentes. Se va llegando a la conclusión de que

en la naturaleza el modo de crecimiento más habitual, el modo "por defecto" por así decirlo, son los biofilms (26), búnkeres defensivos, contra los que, digámoslo así, no sirven las armas empleadas para combatir enemigos que luchan como individuos y al descubierto.

La microbiología aplicada a los procedimientos de limpieza y desinfección ha sido hasta ahora "de base planctónica" y las normas legales relacionadas, también. Hay pues que replantearse unos y otras, buscando nuevos recursos (18, 27-31) y procurando además un uso cuidadoso de los biocidas, ya que la exposición a concentraciones subletales puede inducir resistencia y su liberación al medio ambiente puede causar daños no siempre fáciles de predecir.

Vamos conociendo algunas características de los biofilms, o sea de los búnkeres de laboratorio, pero los reales es previsible que sean más complicados. Un aspecto que añade complejidad al asunto es que en la naturaleza, los biofilms rara vez están habitados por una sola especie.

6. BIOFILMS MULTIESPECIE: MUCHA VIDA SOCIAL

En los biofilms naturales conviven microorganismos compatibles. Cooperativos o al menos comensales. La concentración de células alcanzada en su seno no permite la coexistencia de organismos antagónicos, como pueden a veces observarse transitoriamente en algunos medios planctónicos con baja densidad celular.

Las combinaciones viables entre microorganismos dependen en buena parte del colonizador primario, ésto es, del que llega primero, o mejor dicho, del que consigue formar un biofilm primero, que es el que selecciona cuales de los "visitantes casuales" de otras especies o cepas se quedan en "su" biofilm (32). La asociación condiciona mucho el status de estabilidad y resistencia de algunos colonizadores secundarios.

Veamos como ejemplo el caso de *Listeria monocytogenes*, una especie bastante ubicua, con algunas cepas muy patógenas. Como la listeriosis humana, aunque infrecuente, tiene una mortalidad muy alta (20-30%) hay normas legales muy exigentes en cuanto a la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos que se comercializan como listos para el consumo (100 células viables por 100 g de alimento en Europa) y hay que vigilar muy bien la higiene de las instalaciones para cumplir ese requisito. Esta especie puede formar biofilms en solitario, pero lentamente y con la matriz muy delgada. Pero tambien puede instalarse en los biofilms de *Pseudomonas fluorescens*, por ejemplo, una especie

deteriorativa y frecuente en plantas refrigeradas, que produce rápidamente biofilms gruesos (33). El mismo número de *L. monocytogenes* por cm^2, instalado solo o "bien acompañado", representa situaciones bien distintas para el higienista. Todavía sin embargo, las pruebas de productos de limpieza y desinfección se suelen hacer con biofilms monoespecie.

Volviendo al tema de las diversas especies que cohabitan en los mismos biofilms, algunas comunidades, estudiadas in-situ mediante técnicas que no requieren cultivo, parecen mostrar ciertas pautas de ordenación. Es el caso de la microflora oral, en cuyos biofilms participan unas 500 especies bacterianas, coagregadas de forma característica (34, 35).

Además de bacterias, en los biofilms (o sobre ellos) se pueden encontrar virus (un tema muy poco estudiado) (36) y formas de vida superiores, algas, protozoos y diversos invertebrados, que pueden mantener entre sí distintos tipos de relaciones ecológicas (37, 38). Se han estudiado por ejemplo las comunidades presentes en diversos tramos de tuberías de desagüe domésticas e industriales (ambientes muy ricos en nutrientes) y en las tuberías de agua de suministro (ambientes más oligotróficos).

Como es de esperar, en los medios muy oligotróficos o extremos suelen encontrarse biofilms sencillos, o sea, de una o pocas especies, que son por ello más fáciles de controlar (es el caso de los biofilms de *Legionella* en las conducciones de ventilación de aire acondicionado) (39). Las tuberías vienen a ser reactores de flujo más o menos continuo, que se interrumpe de vez en cuando por eventos especiales, como un chorro de lejía en el desagüe, o una tormenta, o una entrada de aire (por ejemplo, al arreglar una avería) con el consiguiente aumento de turbulencia y con desprendimiento de fragmentos adheridos, en el caso del agua de suministro. En los conductos de traídas de aguas, la matriz del biofilm va incorporando con el tiempo sales y partículas, haciéndose así más dura y rugosa. Esto, junto con la disminución de la luz del conducto, contribuye también al aumento de la turbulencia y el desprendimiento de partículas, lo que empeora la calidad higiénica y técnica del agua.

Un caso muy característico en el que las comunidades microbianas soportan una cantidad importante de otras formas de vida adheridas, es el de los cascos de los barcos (40, 41). Sobre las primeras capas de bacterias y algas, pueden crecer una gran diversidad de invertebrados, muchos de ellos con exoesqueleto duro, moluscos por ejemplo. Los biofilms pueden ahí alcanzar varios centímetros de grosor y eso aumenta mucho el rozamiento del casco del barco al desplazarse, disminuyendo la velocidad alcanzable. Este "bioensuciamiento" hace aumentar

el gasto de combustible y las pérdidas por tener el barco inactivo durante las paradas para limpieza. Además, los productos químicos empleados para el desprendimiento son frecuentemente muy contaminantes. Hay por eso actualmente muchos proyectos en marcha para desarrollar componentes antibiofilm para pinturas y recubrimientos para barcos de todo tipo.

7. LOS BIOFILMS "BUENOS"

Aunque suele ocurrir que de lo malo se habla más, también hay por supuesto biofilms útiles para los humanos. Biofilms naturales útiles son por ejemplo los que forman las bacterias fijadoras de nitrógeno sobre las raíces de las leguminosas, aumentando el rendimiento de éstas y mejorando la calidad agrícola de los suelos.

La utilización más extendida de determinados biofilms "de diseño" son los tratamientos secundarios para aguas residuales urbanas, aunque también se van empleando cada vez más para las aguas residuales industriales, para biorremediación y también para aprovechamiento de residuos de minería.

En el mundo alimentario hay biofilms empleados tradicionalmente para la elaboración de alimentos; es el caso de la levadura "flor" que se desarrolla en una interfase líquido/aire, la superficie de los vinos finos y olorosos. Un biofilm puede considerarse como una forma natural de inmovilización de células microbianas y como tal se emplean para la producción industrial de algunos aditivos alimentarios, ácidos orgánicos, por ejemplo.

Hay otro aspecto positivo de la formación espontánea de biofilms: es el fenómeno de exclusión competitiva. Algunos colonizadores primarios (por ejemplo, determinadas bacterias lácticas) excluyen a otros potenciales colonizadores (por ejemplo, *L. monocytogenes*). Esto ha sido estudiado por ejemplo en desagües de plantas de procesado de aves (42). Sería pues un caso de antagonismo, opuesto al ya citado de cooperación entre *P. fluorescens o putida* frente a algunas cepas de *Listeria*, que apuntábamos antes.

8. LOS BIOFILMS "MALOS"

Dado que los biofilms son una forma de resistencia o de supervivencia de los microorganismos, hay bastantes casos y situaciones en que pueden constituir un problema para nuestra especie.

Como ya se ha mencionado, el tema más importante son las infecciones. La formación de biofilms en el organismo hace a los patógenos más innacesibles, más resistentes a los mecanismos defensivos naturales y a los tratamientos con antibióticos u otros biocidas, cronificando la infección (3, 4, 21). El asunto es particularmente difícil cuando falla algún aspecto defensivo. Es el caso de la fibrosis cística, una enfermedad hereditaria y recesiva que afecta a las glándulas secretoras; el exceso de mucus en las vías respiratorias alimenta el crecimiento de biofilms microbianos, cuya matriz tiende a ocluir los conductos. También han sido muy estudiados los biofilms que se desarrollan en los grandes quemados, con mucha superficie corporal expuesta a las infecciones y un sistema inmune desbordado. Una colonización con grandes costes para el sistema sanitario es la de los catéteres e implantes, que con cierta frecuencia han de ser sustituidos por esta razón, particularmente en el caso de pacientes inmunodeprimidos.

Aparte de los biofilms que crecen en el interior del cuerpo, interesan mucho en el mundo sanitario los que pueden crecer en equipos e instalaciones (quirófanos, unidades dentales, unidades de diálisis, etc.) ya que los distintos fluidos y materiales a los que se pueden transferir fragmentos de biofilm, pueden entrar en contacto con heridas abiertas. Además, la exposición subletal a desinfectantes (y otros biocidas), al intentar sin éxito eliminar las células de un biofilm, induce la aparición de resistencias. El empleo de dispositivos o piezas de un solo uso es un recurso útil, pero no siempre aplicable. Preocupa particularmente en el contexto clínico la mayor frecuencia de la transferencia genética horizontal observada dentro de los biofilms (43) que podría ampliar considerablemente la velocidad y diversificación de la extensión de las resistencias a biocidas. Muchos de los problemas que se plantean en este contexto son similares a los que pueden aparecer en la industria alimentaria, aunque los recursos para combatirlos son en este caso mucho más modestos.

La cadena de suministro de alimentos (producción y transporte de materias primas, procesado, almacenamiento y distribución) tiene diversos aspectos relacionados con el desarrollo de biofilms (19, 27-29, 44). Suelen ser prioritarios los aspectos sanitarios, debidos a la proliferación y persistencia de patógenos, pero también son importantes los aspectos técnicos y de calidad. Con frecuencia, estos aspectos están estrechamente ligados y es difícil tratarlos de forma independiente en la práctica. Porque los microorganismos responsables de unos y otros están ubicados en los mismos biofilms, o porque un problema puede desencadenar otro. Por ejemplo, los biofilms que se desarrollan sobre una superficie intercambiadora de calor (un problema técnico) pueden actuar como aislantes térmicos y ser la causa de un calentamiento insuficiente y de esa forma de la fabricación de un pro-

ducto no seguro desde el punto de vista microbiológico (un problema sanitario). Otros problemas técnicos frecuentes derivados de la formación de biofilms son la oclusión de placas o membranas filtrantes, el atascamiento de tuberías y desagües, el cierre incompleto de válvulas y el bioensuciamiento de superficies de dispositivos de control o medida. En el caso de presencia de biofilms de bacterias sulforreductoras (muy infrecuentes en el entorno alimentario, pero importantes en petroquímica) el principal problema es la corrosión.

El principal problema sanitario de los biofilms en la industria alimentaria es que, al resistir muchos de los tratamientos de limpieza y desinfección convencionales, los microorganismos alojados pueden hacerse persistentes en la planta y comportarse como reservorios de patógenos, que en algún momento pueden transferirse al alimento, antes, durante o después del procesado. Los casos más estudiados son sin duda los referentes a Listeria (45, 46).

9. FACTORES QUE PROPICIAN EL DESARROLLO DE BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La eficacia de la función específica de un equipo o instalación depende en buena medida del material con que está construido. En el caso de las superficies en contacto con alimentos, además, ese material, al igual que el diseño, ha sido elegido porque no favorece la incorporación al alimento de contaminantes químicos o microbianos. En otras palabras, porque se limpia bien y se ensucia relativamente poco.

Esto sigue siendo vigente al incorporar el criterio de minimizar el riesgo de aparición de biofilms. En particular, hay al menos tres cuestiones a tener en cuenta. Por una parte que las superficies hidrofóbicas en general parecen menos favorables a la adhesión primaria. Esto es importante para zonas barridas por un flujo tangencial, pero no tanto cuando se produce una deposición orgánica no afectada por el flujo. En segundo lugar, que la mayoría de las películas condicionantes favorecen el desarrollo de un biofilm sobre ellas (47), aunque algunos componentes parece que podrían formar películas desfavorables. Es pues conveniente eliminar restos orgánicos, incluyendo restos de matriz de biofilm, aunque las células en ellos contenidas ya no sean viables. Y tercero, que son preferibles los materiales duros, que soporten los tratamientos de limpieza sin rayaduras.

Sin embargo, en la industria alimentaria los materiales empleados son relativamente poco diversificados y con frecuencia poco relacionados con las ca-

racterísticas físicas, sobre todo superficiales aunque también reológicas, del alimento que se va a procesar en contacto con ellos. Una mejor selección del material y el empleo de un surfactante de uso alimentario pueden mejorar los resultados y sería conveniente tener este aspecto en cuenta en el momento de la formulación o reformulación de un alimento. A veces un factor externo puede contribuir a la interacción entre alimento y superficie; es el caso de la humedad ambiental. Las piezas o recubrimientos a base de geles de proteína o almidón, por ejemplo, tienden al secarse a hacerse más cohesivos con la superficie en contacto y a dejar así más residuos al desprenderse; residuos que a su vez son más cohesivos que la superficie limpia para las piezas siguientes.

Las propiedades originales de las superficies abiertas suelen verse empeoradas por efecto de la abrasión que suele conllevar la limpieza manual o el efecto cáustico de algunos productos de limpieza. Los arañazos, grietas y puntos de corrosión son lugares propicios a la deposición de materia orgánica y el desarrollo prolongado de biofilms. Las superficies internas de circuitos cerrados, higienizables de forma frecuente y reproducible por procedimientos CIP (Cleaning-In-Place), que no comportan daños superficiales, son más seguras en este sentido.

A veces puede haber de origen un diseño deficiente de las superficies abiertas, con muchos ángulos, recovecos y junturas. Lo más frecuente es sin embargo que los peores sitios sean consecuencia de arreglos o ampliaciones posteriores al montaje de la planta: soldaduras con mucho relieve, reparaciones poco netas, o acoplamiento mal integrado de elementos nuevos, con por ejemplo tramos largos de cintas transportadoras o líneas de procesado que se cruzan para adaptarse al espacio disponible (complicando el control de cada línea), o que dejan poco espacio para pasar o limpiar. Por cierto que las cintas y otros elementos transportadores suelen ser de los componentes más difíciles de mantener libres de biofilms, por sus articulaciones y por la exposición a aerosoles, salpicaduras, etc. También hay que evitar suelos o recubrimientos de suelos con defectos de nivelado, que permiten charcos. Todo ello aporta puntos que acumulan restos orgánicos y agua, y son poco accesibles para la limpieza y desinfección. Un punto particularmente importante son los desagües, a los que se podría llamar, junto con las zonas circundantes, el paraíso de los biofilms resistentes a biocidas; requieren vigilancia para evitar atascos, junto con un aclarado cuidadoso y un desmontaje y muestreo frecuentes.

Está por otra parte la cuestión del mantenimiento de los equipos, empezando por la vigilancia y frecuencia de sustitución de piezas que sufren mucho desgaste y cuyas irregularidades de relieve pueden proporcionar refugio para los

microorganismos. La humedad ambiental en una planta de procesado, que suele subir mucho durante la limpieza y desinfección abierta, puede causar abombamiento y desprendimiento de la pintura de paredes y techos, transportando fragmentos de biofilms antiguos y abriendo huecos donde pueden establecerse otros nuevos.

La materia prima perdida por corte o vertido poco preciso, fricción o adhesión a la superficie en contacto, representa casi siempre materia orgánica que puede alimentar el desarrollo de biofilms, ya sea sobre la superficie en contacto con el alimento o sobre paredes, suelos u otras superficies que no se limpian a diario de forma reproducible. A veces los problemas de generación y dispersión de residuos están originados por una función técnicamente difícil de perfeccionar. Cuantos más residuos deje el procesado y cuanto más sinuosa sea la sala o más abarrotada de aditamentos esté, mayor es el riesgo de que queden partículas desplazadas por algún rincón y por tanto, más rigurosa ha de ser la limpieza.

Hay que tener en cuenta que la limpieza con chorros de agua o vapor a presión desprende biofilms, pero tambien los fragmenta y dispersa en las gotas de los aerosoles generados. Estas gotas pueden permanecer en suspensión en el aire durante un tiempo que con frecuencia supera el de parada de los equipos para limpieza y desinfección, depositándose después poco a poco por toda la planta recién limpia o con un nuevo ciclo de producción en marcha. Esta redistribución por aerosoles "deslocaliza" los biofilms, que pueden pasar de los sitios esperables a otros menos vigilados o accesibles, facilitando la persistencia en la planta de los microorganismos implicados.

Generalmente, la eficacia de los procedimientos de limpieza y desinfección se mide por la concentración residual de microorganismos viables por centímetro cuadrado. Aunque ese parámetro se consiga bajar, los restos de matriz de biofilm que quedan tras la pérdida de viabilidad de las células se comportan como película condicionante, que favorece la incorporación de nuevas células y el desarrollo de un nuevo biofilm sobre el antiguo (19, 47). Por eso tienen interés los tratamientos enzimáticos que desprenden, erosionan o permeabilizan la matriz de los biofilms (48, 49).

Los biofilms están llevando a una revisión general de las normas higiénicas en la industria alimentaria (30, 50, 51) y, dentro de los sistemas de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC), al diseño de programas de limpieza y desinfección "customizados", esto es, pormenorizados y ajustados a los detalles de operación, diseño y status de mantenimiento de cada planta concreta (29, 52).

10. BIBLIOGRAFÍA

1. O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol*. **54:** 49-79.
2. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol*. **56:** 187-209.
3. Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002) Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev*. **15:** 167-193.
4. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural world to infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol*. **2:** 95-108.
5. Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. (2005) Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol*. **13:** 7-10.
6. Parsek, M. & Singh, P. (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol*. **57:** 677-701.
7. Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L. & Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. **13:** 20-26.
8. Simões, M., Pereira, M. O. & Vieira, M. J. (2007) The role of hydrodynamic stress on the phenotypic characteristics of single and binary biofilms of *Pseudomonas fluorescens*. *Water Sci. Technol*. **55:** 437-445.
9. An, D. & Parsek, M. R. (2007) The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Curr. Opin. Microbiol*. **10:** 292-296.
10. Monds, R. D. & O'Toole, G. A. (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol*. **17:** 73-87.
11. Parsek, M. R. &Tolker-Nielsen, T. (2008) Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr. Opin. Microbiol*. **11:** 560-566.
12. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol*. **184:** 1140-1154.
13. Cotter, P. A. & Stibitz, S. (2007) c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol*. **10:** 17-23.
14. Jayaraman, A. & Wood, T. K. (2008) Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **10:** 145-67.
15. Ammor, M. S., Michaelidis, C. & Nychas, G.-J. E. (2008) Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. Review. *J. Food Protect*. **71:** 1510-1525.
16. Annous, B. A., Fratamico, P. M. & Smith, J. L. (2009) Quorum sensing in biofilms: Why bacteria behave the way they do. *J. Food Sci*. **74:** R24-R37.

17. Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Minervini, F. & Limitone, A. (2007) Cell-cell communication in food related bacteria. *Int. J. Food Microbiol*. **120:** 34-45.

18. Richards, J. J. & Melander, C. (2009) Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem*. **10:** 2287-2294.

19. Verran, J., Airey, P., Packer, A. & Whitehead, K. A. (2008) Microbial retention on open food contact surfaces and implications for food contamination. *Adv. Appl. Microbiol.* **64:** 224-246.

20. Matz, C. & Kjelleberg, S. (2005) Off the hook-how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol*. **3:** 302-307.

21. Cloete, T. E. (2003) Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int. Biodet. Biodegrad*. **51:** 277-282.

22. Turner, R. J., Zannoni, D., Hynes, M. F. & Ceri, H. (2008) Antimicrobial agents and biofilms: resistance/tolerance is multifactorial. *Chimica Oggi.* **26:** 18-20.

23. Brown, M. R. W. & Gilbert, P. (1993) Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J. Appl. Bacteriol. Symp*. **74 (Suppl):** 87S-97S.

24. Lewis, K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*. **45:** 999-1007.

25. Stewart, P. & Costerton, J. W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. **358 (9276):** 135-138.

26. Jefferson, K. K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* **236:** 163-173.

27. Brooks, J. D. & Flint, S. H. (2008) Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *Int. J. Food Sci. Technol*. **43:** 2163-2176.

28. Chmielewski, R. A. N. & Frank, J. F. (2003) Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. **2:** 22-32.

29. Fratamico, P. M., Annous, B. A. & Gunther IV, N. W. (2009) Biofilms in the food and beverage industries. CRC and Woodhead Publ. Ltd. ISBN 9781845694777.

30. Manivannan, G. (editor) (2008) Disinfection and decontamination. Principles, applications and related issues. CRC Press. ISBN 978-0-8493-9074-6.

31. Shi, X. & Zhu, X. (2009) Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci Technol*. **20:** 409-413.

32. Carpentier, B. & Chassaing, D. (2004) Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *Int. J. Food Microbiol*. **97:** 111-122.

33. Sasahara, K. C. & Zottola, E. A. (1993) Biofilm formation by *Listeria-monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *J. Food Prot*. **56:** 1022-1028.

34. Avila, M., Ojcius, D.M. & Yilmaz, O. (2009) The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol*. **28:** 405-411.

35. Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T. & Maeda, N. (2009) Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J. Dental Res*. **88:** 982-990.

36. Heistad, A., Scott, T., Skaarer, A. M., Seidu, R., Hanssen, J. F. & Stenstrom, T. A. (2009) Virus removal by unsaturated wastewater filtration: effects of biofilm accumulation and hydrophobicity. *Water Sci. Technol*. **60:** 399-407.

37. Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B. & Givskov, M. (2002) Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol*. **78:** 79-97.

38. Nadell, C. D., Xavier, J. B. & Foster, K. R. (2009) The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol. Rev*. **33:** 206-224.

39. Taylor, M., Ross, K. & Bentham, R. (2009) *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb. Ecol*. **58:** 538-547.

40. Almeida, E., Diamantino, T. C. & de Sousa, O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progr. Org. Coatings.* **59:** 2-20.

41. Hopkins, G. A. & Forrest, B. M. (2008) Management options for vessel hull fouling: an overview of risks posed by in-water cleaning. *ICES J. Mar. Sci*. **65:** 811-815.

42. Zhao, T., Podtburg, T. C., Zhao, P., Schmidt, B. E., Baker, D. A., Cords, B. & Doyle, M. P. (2006) Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. *Appl. Environ. Microbiol*. **72:** 3314-3320.

43. Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol*. **14:** 255-261.

44. Tarver, T. (2009) Biofilms, a threat to food safety. *Food Technol*. **63 (2):** 46-52.

45. Møretrø, T. & Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*. **1:** 107-121.

46. Vázquez-Villanueva, J., Orgaz, B., Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J. V. & SanJose, C. (2009) Predominance and persistence of a single clone of *Listeria ivanovii* in a Manchego cheese factory over six months. *Zoonoses Public Health* (en prensa).

47. Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gymoese, P. & Vogel, B. F. (2007) Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* **18:** 1165-1171.

48. Xavier, J. B., Picioreanu, C., Rani, S. A., Loosdrecht, M. C. M. V. & Stewart, P. S. (2005) Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix-a modelling study. *Microbiol*. **151:** 3817-3832.

49. Orgaz, B., Neufeld, R. J. & SanJose, C. (2007) Single-step biofilm removal with delayed release encapsulated Pronase mixed with soluble enzymes. *Enz. Microb. Technol*. **40:** 1045-1051.

50. Gibson, H., Taylor, J. H., Hall, K. E. & Holah, J. T. (1999) Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *J. Appl. Microbiol*. **87:** 41-48.

51. Wirtanen, G. & Salo, S. (2003) Disinfection in food processing-efficacy testing of disinfectants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*. **2:** 293-306.

52. Tomaselli, Y. (2006) Integrated management of cleaning and disinfection programs for bio-adhesion control and biofilm removal in food industries-a review. *Mitteil. Lebensmittel. Hyg*. **97:** 209-225.

6. Bacterias patógenas emergentes transmisibles por los alimentos

PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

1. INTRODUCCIÓN

Es de todos conocido que los alimentos permiten el desarrollo de: (a), microorganismos responsables de enfermedades transmisibles al hombre (zoonosis) (b), microorganismos responsables de enfermedades no transmisibles al hombre (c), microorganismos de contaminación exógena responsables de toxiinfecciones alimentarias (TIA), y (d) microorganismos saprofitos, alterantes de los alimentos o involucrados en la producción de alimentos fermentados. Asimismo, como microorganismos patógenos emergentes responsables de TIA se consideran aquéllos con una mayor incidencia o virulencia en las personas por lo que conviene conocer los factores que favorecen su auge y propagación por los alimentos. Muchas bacterias patógenas emergentes transmisibles por los alimentos (BPEA) derivan de la adquisición de genes que codifican factores de virulencia y de resistencias a antibióticos y otros antimicrobianos, lo que incrementa su patogenicidad y capacidad de eludir los tratamientos profilácticos y terapeúticos para reducir su presencia en los animales, alimentos y personas. También conviene conocer la existencia de procesos crónicos o secuelas producidos por BPEA así como establecer procedimientos para controlar, reducir o eliminar su presencia en los animales portadores y los alimentos.

2. MICROORGANISMOS PATÓGENOS EMERGENTES TRANSMISIBLES POR LOS ALIMENTOS

Un amplio número de microorganismos patógenos (bacterias, virus y parásitos) se han transmitido de los alimentos al hombre durante miles de años. Tam-

bién durante las últimas décadas se ha reconocido la existencia de microorganismos patógenos emergentes de los alimentos (MPEA) responsables de enfermedades en las personas (1). Actualmente, como MPEA se consideran los responsables de enfermedades cuya incidencia en las personas ha aumentado

Tabla 1. *Patógenos emergentes de los alimentos.*

Confirmados (1970-1985)	
Salmonella enterica serovar Enteritidis	*Campylobacter jejuni*
Clostridium botulinum (botulismo infantil)	*Campylobacter coli*
	Helicobacter pylori
Escherichia coli O157:H7	*Vibrio cholerae O1*
Yersinia enterocolitica	*Vibrio vulnificus*
Listeria monocytogenes	*Vibrio parahaemolyticus*
Cryptosporidium parvum	*Norovirus*
Giardia lamblia	*Rotavirus*
Toxoplasma gondii	*Virus de la hepatitis A*

Posteriormente	
Prion de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	(1986)
Arcobacter spp.	(1991)
Escherichia coli EHEC, serotipos no-O157	(1996)
Vibrio cholerae O139	(1997)
Salmonella enteritidis subsp. *enterica* biovar Typhimurium DT104	(1997)
Cyclospora cayetanensis	(1997)
Adenovirus, Saprovirus, Astrovirus, Coronavirus, Aichivirus, virus hepatitis E	(1998)

Actualmente o en un futuro próximo
Otras subpoblaciones de *S. enteritidis*
Otros tipos patógenos y/o serotipos de *E. coli*
Yersinia pseudotuberculosis
Otros *Campylobacter* spp.
Otros *Arcobacter* spp.
Cronobacter spp.
Complejo *Enterobacter cloacae*
Bacteroides fragilis
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*
Enterococos resistentes a la vancomicina y *E. faecalis* con múltiples factores de virulencia
Staphylococcus aureus resistentes a la meticilina (MRSA)
Saccharomyces boulardii
Otros virus, además de los citados
Otros parásitos, además de *C. cayetanensis*
Otras bacterias, virus y parásitos derivados de la transmisión horizontal de factores de virulencia o de otros mecanismos de recombinación genética

durante las dos últimas décadas o que podrían incrementarse en un futuro próximo, así como los responsables de nuevas enfermedades o de enfermedades que se manifiestan con signos clínicos diferentes (2-4). Los MPEA derivan, fundamentalmente, de modificaciones genéticas resultantes de la adquisición de nuevos genes, de la pérdida de otros, de mecanismos de recombinación genética, de la transmisión horizontal de factores de virulencia y de resistencias a agentes antimicrobianos, de resistencias a los nuevos métodos de procesado y conservación de los alimentos y de un control inadecuado de la protección de la salud pública. Otras características de los MPEA son su rápida propagación y fácil difusión, el afectar a sectores poblacionales muy sensibles (niños, ancianos e inmunodeprimidos), y, algunos, ser responsables de lesiones permanentes o secuelas. En la Tabla 1 se enumeran, no exhaustivamente, algunos MPEA responsables de TIA (5-9). En la Tabla 1 no se consideran como MPEA el virus subtipo H5N1 de la influenza aviar tipo A altamente patógeno (HPAI A/H5N1) ni el virus de la influenza A subtipo H1N1 [A(H1N1)], algunas de cuyas cepas son endémicas en personas y otras en cerdos y aves, porque su transmisión por los alimentos a las personas todavía no se ha demostrado fehacientemente.

3. FACTORES QUE FAVORECEN EL AUGE DE LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS EMERGENTES DE LOS ALIMENTOS

Parece razonable asumir que el reciente desarrollo de técnicas bioquímicas, inmunológicas y genéticas más sensibles y eficaces para el aislamiento e identificación de dichos microorganismos de los animales, alimentos y personas han jugado un papel importante en su identificación y cuantificación como responsables de TIA. Igualmente lo han sido los cambios demográficos y de comportamiento nutricional de la población con nuevos hábitos nutritivos basados en el consumo de platos preparados y precocinados y de los servicios de restauración colectiva con las consecuencias sanitarias desafortunadas derivadas de un error en su manejo y control. Además, la demanda social de alimentos más "naturales", "sanos", "saludables" o "convenientes", también ha conducido a la producción de alimentos menos procesados y menos seguros microbiológicamente (10, 11). Los cambios en los métodos de procesado y conservación de los alimentos han tenido también su reflejo en el desarrollo de los MPEA (9). Hasta 1950 los microorganismos patógenos conocidos transmisibles por alimentos eran *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*, a los que un poco más tarde se sumó *Bacillus cereus*. El empleo masivo de la refrigeración

en la cadena alimentaria y en los hogares permitió, en la década de los 60, la identificación de *Yersinia enterocolitica* como MPEA por su desarrollo a temperaturas cercanas a los 0 ºC. La incorporación en la moderna industria alimentaria de metodologías de inactivación microbiana basadas en la utilización de diversos tipos de estrés y de tratamientos subletales, como en los alimentos mínimamente procesados (MPF), han facilitado que la resistencia microbiana a un estrés confiera resistencia a otros. El reconocimiento de la existencia de formas viables pero no cultivables (VBNC) de algunos microorganismos responsables de TIA también ha permitido identificar su presencia en los alimentos. Microorganismos como *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori*, *H. pullorum*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholerae* 01 y 0139, y *Arcobacter* spp. son MPEA con las características previamente citadas.

Un mayor consumo por las personas de hortalizas, frutas y zumos también ha propiciado un incremento en el número de brotes de TIA. En otoño de 2006 se produjeron en EE.UU. cuatro brotes epidémicos independientes ligados al consumo de espinacas, tomates y lechugas con cepas de *Salmonella* spp. y *E. coli* enterohemorrágico (EHEC, O157:H7) (12). Una revisión, durante los años 1973 a 1997, de brotes de TIA en EE.UU. identificó 190 brotes asociados al consumo de hortalizas, frutas y zumos con 16.000 enfermos, 600 hospitalizados y 8 fallecidos. La mayoría de las TIA se debieron a norovirus (40%), *Salmonella* spp. (18%) y *E. coli* EHEC (8%), aunque otros microorganismos implicados fueron *Clostridium* spp. (6%), virus de la hepatitis A (4%), *Shigella* spp. (4%), *Bacillus* spp. (3%) y *Staphylococcus* spp. (3%) (13). Otros estudios reflejan también la relación entre el consumo de frutas, verduras y zumos y los brotes de TIA en otros países y lugares geográficos (14, 15). El comportamiento de enterobacterias y virus de permanecer en las tierras de cultivo, de formar biofilms, o de su internalización en las verduras y frutas favorecen los brotes de TIA mediados por el consumo de alimentos vegetales (16). Desde hace tiempo se conoce la translocación de *E. coli* EHEC, del estiércol y del agua de regadío contaminadas, a las hojas de las lechugas y su internamiento en las células vegetales (17), así como la utilización por *E. coli* EHEC de los filamentos EspA para adherirse a las hojas de las lechugas (18). También se ha descrito el internamiento de microorganismos responsables de TIA en protozoos aislados de espinacas y lechugas (19). La internalización y supervivencia de MPEA (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* EHEC, *L. monocytogenes, H. pylori, M. bovis* y *S. aureus*) en protozoos como *Acanthamoeba castellani*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes* y *Tetrahymena pyriformis* también se conoce, lo que sugiere que la asociación entre MPEA y protozoos es intensa lo que permite reconocer porqué, además de la formación de biofilms, algunos MPEA persisten en los equipos de

procesado y en alimentos a pesar de las operaciones, diarias y regulares, de limpieza y desinfección (20, 21).

Los sistemas agrarios actuales de producción de alimentos y de ganadería intensiva también facilitan la prevalencia y auge de los MPEA. Un comercio y un turismo internacional globalizado también favorecen la distribución y dispersión de los MPEA ya que la producción y comercialización de los alimentos en gran escala facilita su difusión y la posibilidad de contaminaciones cruzadas con otros alimentos. La capacidad de algunos MPEA de formar películas biológicas (*biofilms*) les permite sobrevivir a numerosos procesos de conservación y eluir tratamientos de limpieza y desinfección.

Otros factores que favorecen el auge de las TIA por MPEA son la edad siendo, generalmente, los niños y mayores los más sensibles, así como la gestación, la hospitalización, el consumo de antibióticos, el alcoholismo y el incremento de una población inmunodeprimida por enfermedades o por agentes inmunosupresores en terapias de cáncer, de trasplantes de órganos o por el síndrome de inmunodeficencia adquirida (SIDA) (22-24). En el auge de los MPEA conviene destacar la letalidad de la cepa patógena, sobre todo, en aquéllas infecciones en que su letalidad depende de la presencia y expresion de diversos factores de virulencia. La malnutrición, entendida como deficiencia en la ingestión de nutrientes, también constituye una causa, sospechada pero dificilmente probada, de incremento de TIA por MPEA. Algunos resultados demuestran que manipulaciones dietéticas simples como el incremento del estrés oxidativo en los animales, eliminando antioxidantes de la dieta o con un exceso de prooxidantes, incrementan la virulencia de algunos virus y favorecen la acumulación de mutaciones genómicas (25). Los países subdesarrollados con problemas de malnutrición y deficiencias nutricionales severas pueden ser el lugar de origen de enfermedades nuevas o de las ya conocidas con manifestaciones patológicas diferentes, mientras la malnutrición en sí misma puede ejercer un impacto mucho mayor que el de favorecer las TIA por MPEA (26). El envejecimiento de la población en los países desarrollados o los desastres naturales y de malnutrición de los subdesarrollados, efectivamente, conducen al auge y prevalencia de los MPEA. Pero no cabe duda que las modificaciones genéticas y de adaptación microbiana, así como la aparición de resistencias a agentes antimicrobianos, juegan un papel preponderante en el auge de los MPEA.

Según el informe elaborado por la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) con datos de los 27 Estados miembros de la Unión Europea (UE) durante el año 2007, la campilobacteriosis fue la enfermedad prevalente

en humanos, con 200.889 casos, seguida de la salmonelosis (154.099 casos), yersiniosis (8.795 casos), infecciones por *E. coli* EHEC (2.995 casos), listeriosis (1.558 casos) y triquinosis (867 casos). De los resultados de los tres últimos años se deduce que las campilobacteriosis incrementan en un 14,2% mientras las salmonelosis se reducen en 5,4%, los casos de yersiniosis suben un 11,9%, los de *E. coli* EHEC un 40,9%, y los de listeriosis un 1,8% (The EFSA Journal-223, 2009). De especial preocupación son las infecciones por *L. monocytogenes* con un 20% de tasa de mortalidad, especialmente en las personas de mayor edad, sin olvidar las infecciones, en menor proporción, de personas con *M. bovis*, *Brucella* spp., *Echinococcus granulosus* (87% de los casos) y *E. multilocularis* (4% de los casos). Asimismo, según datos de la EFSA-ECDC sobre brotes de toxiinfecciones alimentarias originadas por alimentos contaminados durante el año 2007, los brotes debidos al consumo de alimentos con *Salmonella* spp. fueron los más comunes (39,2%), seguidos de los de origen desconocido (25,5%), los producidos por virus, incluídos los norovirus (11,9%), y los debidos a *Campylobacter* spp. (8,2%) (The EFSA Journal-271, 2009). De lo descrito se deduce que aunque la campilobacteriosis es la TIA más frecuente por el consumo de alimentos, sin embargo, ocupa el cuarto lugar como responsable de brotes de TIA por el consumo de alimentos.

4. TRANSMISIÓN HORIZONTAL DE FACTORES DE VIRULENCIA Y DE RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS

Las bacterias, de las que conocemos su existencia desde hace unos 3.000 millones años, representan las formas de vida más antiguas conocidas, lo que da fe de su enorme poder adaptativo y evolutivo. La virulencia de las bacterias depende de funciones codificadas en su genoma, de mecanismos de regulación inducidos por las condiciones del medio de desarrollo, y por la inmunidad del hospedador. En los organismos eucariotas la variabilidad genética depende primariamente de su reproducción sexual. En los procariotas, otros factores determinan su tasa de evolución como las mutaciones puntuales, la recombinación genética, y la transferencia de material genético entre diferentes especies e incluso géneros bacterianos. Este último proceso, conocido como de transferencia genética horizontal (TGH), constituye un proceso único de evolución bacteriana y ha conducido a cambios significativos en la composición de los genomas microbianos en periodos relativamente cortos de tiempo (27). Los genes bacterianos se transfieren entre diversos microorganismos por plásmidos, bacteriófagos, transposones conjugativos, simples transposones, integrones, y por islas ge-

nómicas (IG). Y la adquisición de IG es importante como un mecanismo crucial de evolución, diversificación y adaptación bacteriana. Las IG son una clase diferenciada de elementos génicos que codifican genes muy diversos, son de longitud variable (10-200 Kb), se localizan próximas a genes que codifican tRNA, y son inestables debido a la existencia en sus extremos de secuencias repetidas directas (SRD) que promueven su inserción y excisión del genoma bacteriano (28, 29). Pero, como se ha comentado previamente, las IG son interesantes porque codifican genes que por su funcionalidad conducen a su reconocimiento como "islas ecológicas", "islas simbióticas", "islas saprofíticas" e "islas de patogenicidad" (IP). En las islas de patogenicidad (IP), los productos de sus genes contribuyen, directa o indirectamente, al potencial patógeno de la bacteria y a sus lesiones en las personas. El que en las IG su regulación génica recaiga en señales ambientales diferentes, a veces, las convierte en "continentes genómicos".

Los esfuerzos realizados en la secuenciación genómica de numerosas bacterias han demostrado que, además de los genes que codifican funciones metabólicas esenciales la mayoría de genomas bacterianos poseen genes adquiridos por mecanismos de transmisión horizontal (TGH) que codifican otras funciones bacterianas reguladas bajo determinadas condiciones de desarrollo y ambientales (30). Y la mayoría de IG adquiridas por mecanismos de TGH poseen genes que codifican proteínas efectoras o factores de virulencia y de resistencia a antibióticos, así como otros responsables de nuevas funciones metabólicas, lo que favorece la supervivencia de las bacterias patógenas y ambientales (31). La presencia de islas de patogenicidad (IP) se ha identificado en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, lo que contribuye a incrementar su supervivencia, facilitar su desarrollo en el interior de las células eucariotas, y evadir los sistemas celulares de inmunidad innata y adquirida. Las IP portan genes que codifican proteínas efectoras o factores potenciales de virulencia como la producción de adhesinas, de toxinas, de proteínas responsables de la apoptosis celular, de lipasas, de proteasas, de antígenos bacterianos, de proteínas responsables de los sistemas de transporte tipo I, III, IV y V, y de las responsables de fenotipos de resistencia a antibióticos (30). Incluso existe una evidencia cada vez mayor de que las bacterias intestinales con IP desempeñan un papel activo en la difusión de resistencias a antibióticos a otras bacterias durante su paso por el tracto intestinal o con las que comparten temporalmente dicho nicho ecológico (32).

También se conoce que algunas bacterias patógenas emergentes transmisibles por alimentos (BPEA) han evolucionado como un grupo bacteriano especializado en el secuestro de funciones propias de las células eucariotas y de mo-

dificación de sus rutas metabólicas, lo que facilita su supervivencia extracelular e intracelular y evasión del sistema inmune del hospedador. El secuestro de funciones eucarióticas permite a las BPEA dos tipos de vida intracelular, en el interior de vacuolas o en el citosol. Algunas bacterias penetran en células no fagocíticas y se multiplican en una vacuola membranosa. Sin embargo, otras como *L. monocytogenes* y *S. flexneri* persisten en el citoplasma celular por un mecanismo que comprende tres estadios: salida de la vacuola, replicacion intracitoplásmica, y manipulación de la respuesta inmune intracelular (33, 34). En todos los casos y en todas las BPEA dichas funciones se encuentran codificadas por genes localizados en IP. En *L. monocytogenes* su salida de las vacuolas se debe a la acción de las enzimas listeriolisina O (LLO), fosfatidil inositol fosfolipasa C (PI-PLC) y fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC-PLC), su replicación intracitoplásmica depende del transportador de azúcares Hpt y de otros enzimas, mientras su evasión de la respuesta inmune recae en la inhibicion de la autofagia por la célula hospedadora por la producción de las fosfolipasas y la actomiosina A (ActA) (34). Asimismo, aunque la mayoría de las bacterias patógenas son fagocitadas y digeridas por células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, algunas BPEA han desarrollado estrategias biológicas que interfieren con su internalización o fagocitosis. Bacterias como *M. tuberculosis, S. enterica* y *L. monocytogenes* han desarrollado sistemas biológicos eficaces de evasión y modulación de la actividad antimicrobiana de los fagocitos (35).

5. BACERIAS PATÓGENAS EMERGENTES TRANSMISIBLES POR ALIMENTOS

En una breve descripción acerca de las bacterias patógenas emergentes transmisibles por alimentos (BPEA) debemos considerar, en primer lugar, a las del género *Salmonella* que comprenden, solamente, dos especies, *S. bongori* y *S. enterica* y distintas subespecies. A su vez las subespecies de *S. enterica* se subdividen en más de 2.000 serovares, incluyendo algunos de interés en medicina humana y veterinaria. Y conviene conocer que los distintos serovares difieren marcadamente en su virulencia, adaptación y rango de hospedadores ya que, por ejemplo, *S. enterica* serovar Dublin infecta bovinos, *S. enterica* serovar Cholerasuis infecta cerdos y otros mamíferos, *S. enterica* serovar Gallinarum infecta aves, *S. enterica* serovar Typhimurium y *S. enterica* serovar Enteritidis infectan muchos hospedadores incluídas personas, roedores, bovinos, aves y ovinos, y *S. enterica* serovar Typhi y *S. enterica* serovar Paratyphi solamente infectan personas. Ninguna otra bacteria como *S. enterica* muestra una varia-

ción tan enorme de su virulencia y rango de hospedadores específicos aunque todos los estudios a nivel de ADN sugieren un origen clonal de la especie. También se sabe que *S. enterica* posee genes de virulencia adquiridos por TGH y localizados en las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI), en un plásmido de virulencia, en pseudogenes y en bacteriófagos lisogénicos, que contribuyen a su especifidad y virulencia por los distintos hospedadores. La isla de patogenicidad SPI-1 es fundamental en los fenómenos de invasión celular y la SPI-2 para su supervivencia y evasión inmune en macrófagos. Ambas IP codifican tres sistemas de secreción diferentes y algunos genes seguramente serán responsables de su especificidad por distintos hospedadores (36-39). Asimismo, las proteínas efectoras o factores de virulencia producidas por las cepas de *S. enterica* de los serovares no tifoideos y tifoideos determinan, respectivamente, una gastroenteritis aguda con diarrea infmamatoria o una sintomatología de dolor abdominal y fiebre, distinta de la gastroenteritis inflamatoria. Ello se debe a la dificultad de las células eucariotas del hospedador de reconocer a través de sus receptores de reconocimiento de patógenos a los serovares de *S. enterica* tifoideos como bacterias haciendolo como virus o bacterias atípicas por lo que, en el caso de los serovares no tifoideos, se organiza una respuesta inflamatoria exudativa (diarrea inflamatoria) mientras en los serovares tifoideos tiene lugar una respuesta inflamatoria intersticial (dolor abdominal y fiebre) (40).

Las bacterias del género *Campylobacter* (*Campylobacter* spp.) son la causa más frecuente de gastroenteritis humanas encontrándose muy difundidas en la naturaleza, aunque su reservorio más común es el tracto intestinal de los mamíferos y aves, domésticos y salvajes. No obstante, a pesar del papel de *Campylobacter* spp. como responsable de infecciones humanas todavía existen incertidumbres acerca de los mecanismos biológicos de su actividad patógena. Entre los factores de virulencia asociados a *Campylobacter* spp. parece que los flagelos polares juegan un papel activo en su movilidad por el tracto intestinal, adherencia, invasión de las células epiteliales humanas, e inmunidad. Otro de los mecanismos de virulencia puede ser la producción de toxinas, enterotoxinas y citotoxinas, de las que se reconocen hasta seis y de las que solamente el gen responsable de la síntesis de una de ellas (*cdt*) se ha localizado en su genoma. También se conoce que *Campylobacter* spp. invade células epiteliales humanas mediante fenómenos de adhesión e invasión celular lo que origina lesiones celulares, pérdida de funcionalidad y diarrea (41). Asimismo, como ocurre con otras bacterias Gram-negativas el lípido A de los lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular de *C. jejuni* posee actividad endotóxica por lo que una infección sistémica puede originar sepsis y shock, presumiblemente por la liberación de LPS. *C. jejuni* manifiesta una estructura antigénica diversa derivada de sus com-

ponentes lipopolisacáridos (LPS) o lipooligosacáridos (LOS). El interés en el papel de los LPS/LOS en la patogenicidad de *C. jejuni* resulta del reconocimiento de que dichas estructuras manifiestan homología con la de los gangliósidos neuronales, lo que puede contribuir al desarrollo del síndrome de Guillain-Barré (GBS) y de otras neuropatías asociadas como la del síndrome de Miller-Fisher (MFS). *C. jejuni* posee, asimismo, dos plásmidos (pVir y pTet) posiblemente implicados en su virulencia (42, 43).

Las bacterias *Campylobacter* spp. patógenas originan una enterocolitis aguda que, en la mayoría de los casos, tiende a remitir por sí misma y persiste durante una semana. Complicaciones derivadas de infecciones por *Campylobacter* spp. derivan de su dispersión gastrointestinal. Las bacteriemias ocurren en < 1% de los pacientes con enteritis y, sobre todo, en los muy jóvenes o mayores y en los inmunocomprometidos. *C. jejuni* y *C. coli* se reconocen como las especies responsables de la mayoría de las infecciones gastrointestinales humanas, aunque *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis* y *C. concisus* también lo son, y *C. lari* se ha asociado a bacteriemias e infecciones urinarias. Diversos biovares de *C. sputorum* se han asociado también a infecciones extraintestinales. *C. rectus*, *C. showae* y *C. gracilis* se han aislado de infecciones periodontales. Conviene también resaltar que las infecciones por *Campylobacter* spp. originan, a veces, secuelas no-gastrointestinales, infrecuentes pero severas, como una artritis reactiva que afecta múltiples articulaciones, el síndrome de Guillain-Barré (GBS) un desorden desmielinizante del sistema nervioso con debilidad, normalmente simétrica de los párpados y músculos respiratorios, con pérdida de reflejos y que puede ser crónica o incluso mortal, y el síndrome de Miller Fisher (MFS) una variante del GBS caracterizado por oftalmoplegia, ataxia y arreflexia. No obstante, el que muchos individuos se encuentren expuestos a cepas de *C. jejuni* pero pocos desarrollen el síndrome GBS sugiere un cierto papel, todavía no bien evaluado, del hospedador en el desarrollo de esta enfermedad (44).

Las bacterias del género *Listeria* se aislan de suelos, agua, efluentes, numerosos alimentos y de las heces de animales y personas. Los rumiantes son el reservorio natural de *Listeria* spp., mientras el 2-10% de las personas son portadoras de *L. monocytogenes* en heces sin, aparentemente, efectos adversos en su salud. *L. monocytogenes* puede convertirse en endémica de las plantas de procesado de alimentos donde se establece como biofilms en los equipos industriales y plantas de procesado lo que dificulta su eliminación o inactivación. El género *Listeria* comprende las especies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Dos de las especies, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son potencialmente patógenas para el hombre y los animales. Todas

las cepas de *L. monocytogenes* se consideran virulentas para el hombre aunque su virulencia es variable. De *L. monocytogenes* se reconocen 13 serovares patógenos de los que los más involucrados en las listeriosis de origen alimentario son el 4b, 1/2b, 1/2a y 1/2c. *L. monocytogenes* es un microorganismo psicrotrofo que se desarrolla a temperaturas de refrigeración y sobrevive a condiciones ambientales más duras que, incluso, algunas bacterias esporuladas.

La listeriosis originada por *L. monocytogenes* es una enfermedad infrecuente pero seria, de elevada tasa de mortalidad (20-30%) comparada a la de otras TIA y que afecta a poblaciones de elevada susceptibilidad, lo que convierte a *L. monocytogenes* en un microorganismo oportunista que afecta a inmunodeprimidos (cáncer, diabetes, alcohólicos, SIDA, trasplantados, enfermos crónicos de diversas afecciones), mujeres embarazadas, recién nacidos y personas mayores. La severidad de la enfermedad y su asociación con alimentos procesados hacen que el impacto social y económico de la listeriosis sea de los más elevados de las TIA. Igualmente, la enfermedad adopta diversas manifestaciones divididas en dos categorías: (i), "infecciones severas", "listeriosis sistémica" o "listeriosis invasiva" y (ii), "gastroenteritis febril" o "listeriosis no invasiva". La patogenia de la enfermedad se inicia con la llegada de *L. monocytogenes* al tracto gastrointestinal y su paso a través del mismo, lo que depende del número de microorganismos ingeridos, la susceptibilidad del hospedador, y la virulencia del microorganismo. El periodo de incubación suele ser largo. Posteriormente y dependiendo del estado inmunológico del hospedador, *L. monocytogenes* invade los fagocitos y, del hígado y bazo, se transfiere a otros órganos como útero, sangre y sistema nervioso central originando infecciones perinatales, meningitis, septicemias y otras formas atípicas de la enfermedad, de elevada tasa de mortalidad (45). Las secuelas producidas por la listeriosis (11-33% de los casos) son también preocupantes, sobre todo en niños y en afectados por infecciones del sistema nervioso central (SNC).

Conviene conocer que las cepas patógenas de *L. monocytogenes* deben su virulencia a cruzar tres barreras: la intestinal, la sanguíneo-cerebral y la materno-fetal, a su supervivencia cuando son fagocitadas por macrófagos, y a su invasión y supervivencia en células no fagocíticas. Y dicha capacidad se debe a genes que codifican proteínas efectoras o factores de virulencia implicados en su capacidad infectiva, algunos codificados en una IP y, otros, distribuídos por el cromosoma bacteriano. Asimismo, algunos de los genes de virulencia se encuentran regulados por una proteína reguladora de transcripción PrfA. El producto del gen *prfA* es crucial en la virulencia de las cepas patógenas de *L. monocytogenes* ya que aquéllas que no poseen una proteína funcional PrfA son

avirulentas en modelos murinos de infección. La PrfA es una proteína de adhesión al DNA que reconoce un palindrome de 14-pb en la región -40 de los promotores regulados por esta proteína (46). A su vez, la producción y actividad de la PrfA se encuentra regulada por factores ambientales como la temperatura (37 ºC), mientras otros genes reguladores y secuencias cortas de RNA no codificante todavía están siendo evaluados por su papel en la regulación de la producción de otras proteínas efectoras (47, 48). Los mecanismos por los que *L. monoctogenes* regula su comportamiento saprofitico en el medio ambiente (Dr. Jekyll) para convertirse en otro agresivo y patógeno en el hospedador (Mr. Hyde) constituye uno de los retos más apasionantes de la moderna biología molecular (49-51).

Escherichia coli es un microorganismo comensal del tracto gastrointestinal de animales y personas. Sin embargo, es de todos conocido que por mecanismos de transmisión horizontal de factores de virulencia (TGH) determinados clones de *E. coli* adquieren genes que les permiten adaptarse a nuevos nichos ecológicos y originar infecciones. Diversas combinaciones de genes que codifican factores de virulencia han originado tipos patógenos (del inglés "pathotype") de *E. coli* responsables de infecciones en animales y personas. A su vez, las cepas patógenas de *E. coli* se reconocen como intestinales o extraintestinales (ExPEC). Entre las cepas patógenas intestinales de *E. coli* se reconocen las de *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroagregante (EAEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) y *E. coli* de de adhesión y evasión difusa (DAEC), mientras las cepas patógenas ExPEC más comunes son las de *E. coli* uropatógeno (UPEC), *E. coli* asociado a meningitis (MNEC), *E. coli* patógeno de aves (APEC), y *E. coli* responsable de mastitis (MPEC) (52-54). Los distintos tipos patógenos de *E. coli* tienden a ser clonales y se caracterizan por compartir antígenos que definen los distintos serogrupos y serotipos, mientras su actividad patógena es multifactorial. La actividad patógena de de *E. coli* generalmente cursa con colonización de mucosas, evasión del sistema inmune, multiplicación y daño celular y, solamente, *E. coli* EIEC invade y se multiplica en el interior de células epiteliales y macrófagos. En los *E. coli* del tipo EPEC, EHEC y ETEC la especificidad por el hospedador se debe a factores de colonización específicos.

No obstante, el *E. coli* más involucrado en brotes de TIA es el EHEC, reconocido como patógeno desde 1982 y responsable de una diarrea no sanguinolenta o ligeramente sanguinolenta (colitis hemorrágica) y de un síndrome urémico hemolítico (HUS). El principal reservorio de *E. coli* EHEC es el tracto gastrointestinal de los bovinos y los brotes epidémicos iniciales en las personas

se asociaron al consumo de hamburgueas poco procesadas. Sin embargo, posteriormente se ha reconocido que un elevado número de alimentos se asocian a los brotes de enfermedad, situación facilitada por el pequeño número de microorganismos necesarios para iniciar la infección. Las cepas de *E. coli* EHEC del serotipo O157-H7 son las más involucradas en los brotes de TIA pero otros serotipos, particularmente, de los serogrupos O26 y O111 son responsables también de TIA. De entre los factores de virulencia asociados a E. coli EHEC destacan la producción de toxinas similares a las de *Shigella dysenteriae*, reconocidas como Stx (Stx1 y Stx2 y sus variantes) o verocitotoxinas (VT) que dañan las células endoteliales renales y su microvascularización resultando en una inflamación que puede, finalmente, conducir a un síndrome (HUS) caracterizado por anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal agudo. Además de la producción de Stx, la mayoría de *E. coli* EHEC poseen una isla de patogenicidad denominada LEE (del inglés "locus of enterocyte effacement") que codifica un sistema de secreción tipo III (T3SS) con proteínas homólogas a las producidas por *E. coli* EPEC. Ello hace que que el término *E. coli* VTEC se utilize para identificar las cepas que producen Stx y *E. coli* EHEC para las que, además de producir Stx, poseen los genes LEE (55, 56). No obstante, la secuenciación del genoma de *E. coli* EHEC revela la existencia de numerosas IP que codifican por muchos otros factores potenciales de virulencia (52). Asimismo, consistente con la observación que el genoma de *E. coli* EHEC EDL933 contiene 1,34 Mb más de DNA que el de la cepa comensal de *E. coli* K12, la expresión de muchos genes de virulencia se encuentra regulada por reguladores de transcripción codificados en plásmidos o IP, los cuales responden a señales no solamente ambientales sino, también, de comunicación celular (del inglés "quorum sensing") (52).

Las bacterias del género *Yersinia* comprenden quince especies con tres patógenas: *Y. pestis* primariamente patógeno de roedores y agente responsable de la peste bubónica y neumónica de las personas, y *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* transmisibles a las personas por el consumo de agua o alimentos contaminados. Las dos últimas originan síndromes gastrointestinales que pueden desembocar en septicemias en personas inmunodeprimidas, además de ser responsables de procesos crónicos o secuelas. *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* inician su divergencia hace más de 200 millones de años, mientras *Y. pestis* parecer ser un clon derivado de *Y. pseudotuberculosis* (57). *Y. pestis* se separa de *Y. pseudotuberculosis* por un proceso de TGH, de inactivación de algunos genes y de adquisición de dos plásmidos (pMT1 y pPCP1) absolutamente esenciales para su patogenicidad (58). A su vez, *Y. enterocolitica* se ha diferenciado en biotipos y serogrupos de diversa patogenicidad. En cualquier caso, y como en

otros patógenos responsables de TIA, los mecanismos de TGH han jugado un papel determinante en la adquisición de factores de virulencia por las cepas patógenas del género *Yersinia*. El plásmido de virulencia de *Yersinia* (pYV) determina la patogenicidad de *Y. pestis*, *Y, pseutobuberculosis* y *Y. enterocolitica* al codificar un sistema de secreción tipo III (T3SS) que sintetiza proteínas efectoras o factores de virulencia Yop (del inglés "Yersinia outer proteins") que regulan rutas metabólicas de supervivencia y evasión del sistema inmune del hospedador. No obstante, además del pYV las cepas patógenas de *Yersinia* codifican en su cromosoma y en una isla de elevada patogenicidad (IEP) muhas otras proteínas que facilitan su supervivencia y virulencia en el hospedador (59-61).

La inyección por las cepas patógenas de *Yersinia* de las proteínas efectoras Yop en células como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, además de la producción de otros factores de virulencia, resulta en modificaciones de su esqueleto celular, supresión de la inducción de moléculas proinflamatorias e inducción de su apoptosis, lo que facilita la multiplicación extracelular de *Yersinia* en los tejidos del hospedador. A su vez, se conoce que la expresión de las proteínas Yop por el sistema T3SS está regulada por la temperatura (37 ºC) y que la translocación de las proteínas Yop a través de la membrana celular de las células eucariotas se induce por contacto celular. Son a su vez, las proteínas YscM1 e YscM2 las que, esencialmente, regulan la transcripción de las proteínas Yop mediante su interacción con otras proteínas del sistema de transporte y metabolismo de azúcares por *Yersinia* spp. (62). Las infecciones por *Y. enterocolitica* se caracterizan por una diarrea, a veces saguinolenta en personas jóvenes, mientras en los adultos es frecuente la fiebre y un dolor abdominal. Complicaciones como picores, dolores articulares y bacteriemia son también posibles. La infección se adquiere por el consumo de alimentos, agua y productos lácteos contaminados, y por carne de cerdo insuficientemente cocinada. Aunque *Y. enterocolitica* se encuentra en el intestino de mamíferos y aves la mayoría de sus serogrupos patógenos se aíslan de la carne y amígdalas de cerdos (58, 63).

6. PATOGENICIDAD Y SECUELAS O PROCESOS CRÓNICOS POR BACTERIAS PATÓGENAS EMERGENTES TRANSMISIBLES POR ALIMENTOS

La mayoría de infecciones por BPEA cursan con gastroenteritis (diarrea y vómitos) con tres síndromes clínicos diferenciados: (a) gastroenteritis sin leucocitos ni fiebre o poca fiebre (diarrea secretora), (b) gastroenteritis con acumu-

lación de neutrófilos y fiebre (diarrea inflamatoria), y gastroenteritis con dolor abdominal y fiebre con posible ulceración de las placas de Peyer (fiebre entérica), lo que refleja diferencias biológicas y moleculares en su relación patógeno-hospedador. Las responsables de diarreas secretoras son BPEA extracelulares (*V. cholerae* y *E. coli* de los patotipos ETEC, EPEC, EHEC, EDEC) que no atraviesan la mucosa intestinal, no inducen la respuesta inmunitaria del hospedador, generan una inflamación mínima, no acumulan leucocitos, y la producción de toxinas altera la permeabilidad de los enterocitos con diarrea acuosa y pérdida de fluídos. Sin embargo, las asociadas a diarreas inflamatorias son BPEA invasivas (*S. enterica* no tifoideas, *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., EIEC) con sistemas de secreción tipo III (T3SS) y tipo IV (T4SS) responsables de la inyección o internamiento en las células eucariotas de diversas proteínas efectoras o factores de virulencia. Las BPEA invasivas son reconocidas por el sistema de inmunidad innata del hospedador mediante receptores TLRs (del inglés "Toll-like receptors") y/o NLRs (del inglés "NOD-like receptors) que funcionan como "lectores de barras". Todo ello permite al huésped diferenciar las bacterias, virus y parásitos mediante el reconocimiento de MAMPs (del inglés, "microorganism associated molecular patterns") y le permite organizar una respuesta orgánica caracterizada por infiltrados celulares dominados por neutrófilos (pus), fibrinógeno, células necróticas, y elevada permeabilidad vascular. La fiebre es una respuesta no específica del hospedador inducida por citoquinas pirógenas (IL-1b, TNFα e IFNγ) que afectan la regulación de la temperatura corporal. Finalmente, las gastroenteritis con fiebre y dolor abdominal se deben a BPEA invasivas y no invasivas (*S. enterica* serogrupos tifoideos, *Brucella* spp. y cepas patógenas de *Yersinia*) cuya presencia en los tejidos induce la liberación de citoquinas pirógenas pero cuya inflamación intersticial de la mucosa intestinal se caracteriza por una infiltración leucocitaria típica de las infecciones virales, lo que significa que las bacterias responsables de dicha patología son reconocidas por los receptores TLRs/NLRs como bacterias atípicas (40).

También conviene conocer que la biología celular y molecular asociada al modo de acción de los PBEA, extracelulares e intracelulares, pivota en la transferencia de proteínas efectoras o factores de virulencia al interior de las células eucariotas mediante sistemas de secreción T3SS y T4SS, estructuralmente como agujas de inyección, con los objetivos de manipular su citoesqueleto para invadir, multiplicarse o desplazarse en su interior, o para escapar de su actividad inmune, innata o adaptativa (64). La modificación del citoesqueleto de las células eucariotas genera pedestales en las microvillosidades de las células epiteliales intestinales lo que permite la adhesión y fijación de las BPEA extracelulares, mientras la modificación del citoesqueleto y de los microtúbulos intracitoplás-

micos facilita la invasión y acoplamiento intracelular de las BPEA invasivas. Para escapar del sistema inmune del hospedador las BPEA producen otras proteínas efectoras que modifican la presentación de antígenos en la superficie celular (inmunidad adaptativa) o interfieren con la translocación del activador transcripcional pro-inflamatorio NF-kB al núcleo celular (inmunidad innata). El núcleo de las células eucariotas es también el lugar de actuación de muchas otras proteínas efectoras o factores de virulencia inyectados intracelularmente por sistemas T3SS y cuyos efectos están todavía siendo evaluados (64).

Sin embargo, también se observan otras respuestas patógenas, independientes o asociadas a las gastroenteritis. La existencia de procesos crónicos o secuelas, resultantes de TIA previas, es conocida desde hace tiempo, mientras la presencia del microorganismo o sus metabolitos asociados a ellas es sólida o circunstancial. La incidencia de secuelas crónicas se atribuye a un 2-3% de los casos de TIA (65). Por ello, es importante reconocer que los mecanismos de patogenicidad por BPEA no solamente deben considerarse desde la perspectiva de la producción bacteriana de factores de adhesión, invasión, replicación y de síntesis de metabolitos tóxicos, lo cual no es solo unívoco y erróneo sino, también, desde la capacidad de las BPEA de invadir las células eucariotas y de modificar el sistema inmune del hospedador por mecanismos de variación antigénica, ocultación o secuestro, mimetismo o imitación molecular, y estimulación o supresión del sistema inmune del hospedador (40, 64, 66).

En la Tabla 2, se enumeran algunos procesos crónicos mediados por BPEA y otros microorganismos responsables de TIA entre los que destacan alteraciones reumatoides en forma de artritis sépticas o reactivas y espondilitis anquilosantes debidas, posiblemente, a TIA previas por BPEA, extracelulares e intracelulares. Muchas bacterias como *Mycobacterium* spp. y *Salmonella* spp., capaces de evadir las defensas del hospedador, son responsables de infecciones persistentes con síntomas clínicos en personas inmunodeprimidas o con desórdenes inmunológicos, mientras bacterias como *Helicobacter* spp. y especies próximas como *Campylobacter* spp. son responsables de bacteriemias crónicas e infecciones de la piel (67). El síndrome de Guillian-Barré (GBS) se considera como una polineuropatía aguda con diferentes subtipos como la poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, forma clásica de la GBS, la neuropatía axonal motora aguda (AMAN) y la neuropatía axonal sensora y motora aguda (AMSAN). Cerca de 2/3 de los casos de GBS aparecen unas semanas después de una infección del tracto respiratorio o gastrointestinal. Aunque los organismos responsables de dichas infecciones no suelen identificarse, los más implicados en los casos de GBS son el virus de Epstein-Barr, citomegalovirus,

Tabla 2. *Secuelas o procesos crónicos ocasionados por patógenos emergentes.*

Secuela o proceso crónico	Agentes implicados
Enfermedades reumatoides Artritis sépticas, asépticas o reactivas, síndrome de Reiter, espondilitis anquilosantes	*Salmonella spp, Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis, S. flexneri, S. dysenteriae, C. jejuni, E. coli EIEC*
Enfermedades neuromusculares Síndromes de Guilian-Barré (GBS) y de Miller-Fisher (MFS)	*C. jejuni*
Síndrome hemolítico-urémico (HUS) Anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal agudo	*E. coli EHEC, O157:H7*
Hipertiriodismo severo Enfermedad de Graves	*Y. enterocolitica*
Abortos y meningoencefalitis	*L. monocytogenes*
Infecciones sistémicas severas, gangrena	*Vibrio spp.*
Encefalitis crónica, pérdida de audición, visión y retraso mental Individuos inmunodeprimidos	*T. gondii*
Gastritis crónicas y metaplasias	*H. pylori*
Gastroenteritis crónicas	*Norovirus*
Superantígenos microbianos y trastornos autoinmunes Enfermedad reumática del corazón, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, tiroiditis autoinmune, psoriasis, enfermedad de Kawasaki	*Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Yersinia spp., Mycoplasma* spp. Algunos virus
Modificaciones de la personalidad	Inducibles por artritis, enfermedad inflamatoria del intestino, diarreas crónicas, etc.

Mycoplasma pneumoniae y *C. jejuni*, mientras los síndromes AMAN y AMSAN son debidos a infecciones previas con *C. jejuni* (68). Parece ser que los lipopolioligosacáridos (LOS) de la pared celular de *C. jejuni* son similares a gangliósidos (glucolípidos) de membranas del tejido nervioso humano, por lo que anticuerpos generados frente a LOS neutralizarían receptores gangliósidos ori-

ginando una parálisis neuromuscular (69). El síndrome hemolítico-urémico (HUS) observado sobre todo en niños que ingieren *E. coli* EHEC con alimentos contaminados, se debe a la producción por dicha bacteria de toxinas Stx responsables de una anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal agudo (70, 71). Anticuerpos generados frente a lipolisacáridos y proteínas de la pared celular de *Y. enterocolitica* se han involucrado también como agentes etiológicos de la enfermedad de Graves, caracterizada por un hipertiroidismo severo, debido a la producción, por el hospedador, de anticuerpos neutralizantes frente *Y. enterocolitica* con actividad cruzada frente al receptor de la tirotropina, un regulador de los niveles de hormonas tiroideas (72, 73). También se conoce que *L. monocytogenes* es responsable de abortos, trastornos fetales y meningoencefalitis. La certeza, desde 1983, de la implicación de *L. monocytogenes* en brotes de TIA y el reconocimiento de su patogenicidad, sobre todo, en niños, mayores e inmunodeprimidos, han contribuído a que la prevención y control de esta bacteria en los alimentos preparados listos para su consumo sea cada vez más importante.

Otras BPEA y otros microorganismos de transmisión alimentaria contribuyen a infecciones sistémicas severas (*Vibrio* spp.), encefalitis crónicas, pérdida de audición, visión y retraso mental (*Toxoplasma gondii*), así como a gastritis y gastroenteritis crónicas y metaplasias (*Helicobacter pylori* y norovirus). La asociación más conocida entre infecciones bacterianas y cáncer es la de *H. pylori* involucrado en la etiología de dos cánceres, el linfoma MALT (del inglés, "mucossa-associated lymphoid tissue") y el frecuente adenocarcinoma gástrico. Otra relación es la de *Salmonella* spp. y el cáncer de vesícula biliar en personas con una infección crónica tras un episodio agudo (74). Una evidencia cada vez mayor sugiere que determinados PBEA pudieran estar involucrados en enfermedades inflamatorias del intestino incluyendo la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa (CU). La mayor presencia de *C. concisus*, diferentes de *C. jejuni*, en biopsias intestinales de niños con EC sugieren que dichas bacterias son viables en los niños enfermos y que son necesarios más estudios acerca del papel de *C. concisus* en la etiología y patogenia de la EC (75). También desde 1913 se reconoce la similitud de signos clínicos entre la paratuberculosis de los bovinos o enfermedad de Johne con la EC en las personas, lo que ha conducido a la sospecha de que la segunda puede deberse a *M. avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) de transmisión alimentaria (76, 77). La exposición de las personas a MAP podría deberse al consumo de leche de vaca con microorganismos activos que han superado los tratamientos de higienización. Las infecciones con microorganismos que codifican superantígenos, como ciertas toxinas bacterianas y proteínas virales, provocan una mayor actividad inmunoestimuladora que los an-

tígenos convencionales lo que conduce a la liberación de cantidades elevadas de citoquinas proinflamatorias responsables de inflamaciones crónicas, escarlatina y un intenso shock séptico (78-80).

7. OTRAS BACTERIAS PATÓGENAS PREOCUPANTES O QUE PUEDEN SERLO EN UN FUTURO PRÓXIMO

Ya se sabe que *L. monocytogenes* del serotipo 4b se considera una BPEA, lo que se considera preocupante es que: (a) genes que codifican por antígenos de su superficie se identifiquen en cepas avirulentas de *L. innocua*, (b) que algunos genes de virulencia se hayan detectado en cepas no patógenas de *L. ivanovii* y *L. seeligeri,* y (c) que mutaciones constitutivas de su gen regulador *prfA* puedan originar variantes de *L. monocytogenes* más virulentas (46, 81). No obstante la complejidad, no sólo por el número de genes involucrados en su virulencia sino, también, en los mecanismos de regulación trancripcional del saprofitismo hasta su virulencia (82), hace que la posibilidad de que cepas no patógenas de *Listeria* spp. se conviertan en virulentas pueda ser todavía lejana.

De las infecciones debidas a *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC) las infecciones urinarias (UTIs) incluyendo las cistitis y pielonefritis por *E. coli* uropatógeno (UPEC) son frecuentes, sobre todo, en mujeres. El origen de los UPEC parece ser el intestino de dónde se desplazan a la vejiga urinaria y riñón y donde la ingestión de alimentos de origen animal con UPEC serían responsables de, al menos, parte de las colonizaciones. El que algunos UPEC contengan islas genomicas (IG) que contribuyen a su virulencia justifica la necesidad de conocer mejor la etiología y epidemiología de los UPEC responsables de UTIs en las personas (83, 84). Igualmente, el que el plásmido pS88 de *E. coli* S88 (O45:K1:H7), responsable de meningitis en niños recién nacidos y la segunda causa de esta enfermedad en los países industrializados, esté muy relacionado con plásmidos de virulencia de *E. coli* patógenos de aves (APEC) sugiere que ambos plásmidos poseen un ancestro común o que son fácilmente transferibles por TGH (85). Más estudios son necesarios para comprender mejor el papel de los ExPEC de origen humano y animal como agentes zonóticos (86).

Otro género relacionado con *Campylobacter* es el *Helicobacter* del que se separó en 1989. Su especie más representativa es *H. pylori* aislada de individuos sanos y de aquéllos con úlceras duodenales y gástricas. Aunque *H. pylori* se encuentra confinado en las personas su modo de transmisión no se conoce bien lo que dificulta su profilaxis, prevención y control. Asimismo, su presen-

cia en el agua y medio ambiente sugiere la conveniencia de evaluar ambos nichos como ruta potencial de su transmisión a las personas (9, 87). También conviene conocer que *H. pullorum*, identificado en 1994, se ha asociado con enteritis y hepatitis en pollos de engorde y ponedoras y con diarreas, gastroenteritis y trastornos hepáticos en personas. El aislamiento de *H. pullorum* de canales de aves en mataderos y su consideración de BPEA sugieren la conveniencia de conocer mejor sus mecanismos de virulencia y patogenicidad, lo que permitirá establecer mejores medidas de protección y control de su presencia en los alimentos y de su transmisión a las personas (9, 88).

Y. pseudotuberculosis origina TIA caracterizadas por fiebre y dolor abdominal con signos clínicos dificilmente diferenciables de los de una apendicitis aguda, y con complicaciones sistémicas como eritemas nodosos y artritis reactivas. Aunque la transmisión del microorganismo se realiza por el agua y productos lácteos y cárnicos, en los últimos años la incidencia de infecciones por *Y. pseudotuberculosis* se ha incrementado y su transmisión parece ligada al consumo de productos vegetales (89, 90). Lo descrito acrecienta el papel de los alimentos de origen vegetal en la transmisión de BPEA y sugiere la conveniencia de controlar, reducir o evitar su presencia en los productos vegetales. *Y. pseudotuberculosis* IP31758 se diferencia de otras cepas de la misma especie por la adquisición horizontal de factores de virulencia y por originar infecciones con signos clínicos propios de estreptocos del grupo A, lo que sugiere la conveniencia de revisar no solamente la procedencia de las TIA originadas por *Y. pseudotuberculosis* sino la etiología y epidemiología de la especie involucrada (79).

En 1991, el género *Arcobacter* se incluyó en la familia *Campilobacteriaceae* de la división epsilon de las Proteobacterias y, actualmente, comprende siete especies aisladas de numerosos reservorios acuáticos, animales, y alimentos de origen animal. Algunas especies como *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. cibarius* se han aislado de heces de personas sanas y con síntomas clínicos de diarrea y dolor abdominal con bacteriemias asociadas, lo que sugiere que no son meras comensales. Ello hace que las *Arcobacter* spp. citadas se consideren como BPEA cuya transmisión ocurre por el consumo de agua y alimentos contaminados (91). Es posible que la incidencia y prevalencia de infecciones humanas por *Arcobacter* spp. se haya minusvalorado por la ineficacia de las técnicas de detección y por su estrategia de adoptar estados viables pro no cultivables (VBNC). Asimismo, la secuenciación del genoma completo de *A. butzleri* RM4018 ha identificado la ausencia de rutas metabólicas frecuentes en otras bacterias, la presencia de genes que codifican LOS/LPS específicos, y la ausencia de enzimas de restricción, lo que facilitaría la TGH de factores de vi-

rulencia y la plasticidad de su genoma para su adaptación a otros hospedadores y para incorporar otros mecanismos de patogenicidad (92). Por ello, conviene evaluar mejor las características fisiológicas y genéticas de un grupo bacteriano que parece constituir un enlace entre el medio ambiente, saprofitismo y patogenicidad en hospedadores animales y humanos.

Enterobacter sakazakii, previamente reconocido como *Enterobacter cloacae*, se ha clasificado desde 2007 en un nuevo género, *Cronobacter*, mientras la especie *Cronobacter sakazakii* se ha subdivido en seis subespecies (*sakazakii*, *malonaticus*, *turicensis*, *gemoespecie* 1, *muytjensii* y *dublinensis*). Todas las *Cronobacter* spp. se consideran BPEA y se asocian a infecciones en niños, sobre todo recién nacidos, con síntomas de bacteriemia, enterocolitis necrotizante y meningitis con fallecimientos y mal pronóstico por trastornos neurológicos severos en los supervivientes. Este grupo bacteriano también parece involucrado en infecciones en adultos con enfermedades severas o inmunodeprimidos. Aunque la mayoría de los brotes se atribuyen al consumo de leches infantiles suplementadas convendría identificar otros alimentos portadores para clarificar mejor la etiología y epidemiología de TIA producidas por *Cronobacter* spp. También convendría conocer los factores de virulencia asociados a su adhesión, producción de enterotoxinas, translocación, invasión y escape del sistema inmune del hospedador, lo que facilitaría la prevención y control de su patogenicidad en las personas afectadas (93, 94).

Actualmente, el complejo *Enterobacter cloacae* comprende seis especies (*absuriae*, *cloacae*, *hornaechei*, *kobei*, *ludwigii* y *nimipressuralis*). De ellas, la especie *E. hormaechei* se ha asociado a infecciones nosocomiales y a la producción de beta-lactamasas lo que limita las opciones terapeúticas de su tratamiento. Además, su aislamiento de leches infantiles suplementadas, de niños enfermos y de su difícil diferenciación con *C. sakazakii* lo convierten en un microorganismo preocupante que requiere un mayor esfuerzo investigador para clarificar su patogenicidad y su papel como BPEA (95).

El género *Aeromonas* comprende diecinueve especies presentes en muestras clínicas, ambientales, agua y numerosos alimentos. Sin embargo, aunque *Aeromonas* spp. se han aislado de pacientes con heridas, infecciones respiratorias, bacteriemias y gastroenteritis, su papel como responsables de TIA no es concluyente. Por ello, mientras hace unos años *Aeromonas* spp. merecieron la consideración de BPEA actualmente se consideran patógenos oportunistas responsables de infecciones secundarias a las de otros agentes patógenos. No obstante, *A. salmonicida* y *A. hydrophyla* se consideran bacterias patógenas responsables de enfermedades de impacto económico en la acuicultura (9, 96, 97).

En 1984 un subgrupo de *Bacteroides fragilis,* bacterias comensales del intestino de animales y personas, denominado *B. fragilis* enterotoxigénico (ETBF), se identificó como agente causal de diarreas en corderos y, en 1992, en personas. Posteriormente, ETBF se ha asociado a infecciones gastrointestinales y al cáncer de colon. Su único factor de virulencia es una metaloproteinasa (Bft) o fragilisina que induce alteraciones morfológicas en líneas celulares y acumulación de fluídos en el intestino de animales de experimentación. Asimismo, el gen *bft* se encuentra codificado en una isla de patogenicidad (IP) cuyo contenido de G+C difiere del determinado para el cromosómico de *B. fragilis* y flanqueado por transposones conjugativos, lo que sugiere un origen exógeno a *B. fragilis* (98). El que la IP con el gen *bft* se encuentre flanqueada por transposones conjugativos sugiere su posible transferencia a otras células no toxigénicas de *B. fragilis* de origen animal o alimentario por un mecanismo de TGH, lo que acarrería problemas de salud pública debido a la colonización del intestino de las personas y animales con cepas de ETBF responsables de colitis crónicas (99).

Tradicionalmente considerados comensales del intestino de animales y personas, y entre las primeras bacterias ácido-lácticas o bacterias lácticas (BAL) que colonizan el tracto intestinal, los enterococos han suscitado un gran interés en las tres últimas décadas tras la identificación de enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) en 1988 y el reconocimiento de que los enterococos, sobre todo, *E. faecalis* y *E. faecium* son la segunda causa de infecciones hospitalarias humanas. Asimismo, debido a su fortaleza y resistencia a factores ambientales, los enterococos se han considerado tradicionalmente por la industria alimentaria como indicadores de contaminación fecal, por su actividad lipolítica y proteolítica participan en el desarrollo de las características organolépticas de numerosos derivados lácteos y cárnicos, y por su producción de péptidos antimicrobianos o bacteriocinas se consideran de interés como cultivos protectores y probióticos. No obstante, el que enterococos como *E. faecalis* y *E. faecium* codifiquen factores potenciales de virulencia, sean resistentes a la vancomicina y responsables de infecciones nosocomiales severas, los convierte en microorganismos de interés higiénico por su potencial de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos de los alimentos, pero también preocupantes por originar infecciones clínicas severas en personas sensibles. Ya que su capacidad patógena depende del estado inmune del hospedador, los enterococos se reconocen como patógenos oportunistas. Por ello, es aconsejable que tanto el papel de los enterococos en el desarrollo de infecciones severas de las personas como su potencial higiénico en los alimentos sean profundamente evaluados y conocidos, así como su posible transmisión de los alimentos a las personas como BPEA.

Por ello, se está realizando un gran esfuerzo investigador para diferenciar los enterocos patógenos de los comensales. Por técnicas genéticas de MLST (del inglés, "Multilocus sequence typing"), basadas en la identificación de mutaciones puntuales en siete genes que codifican funciones metabólicas, se ha determinado la estructura genética poblacional de *E. faecium* y la existencia de un complejo clonal 17 (CC17) asociado a la mayoría de aislados de infecciones hospitalarias en los cinco continentes. Otras características asociadas al CC17 son su resistencia a la ampicilina y quinolonas y la presencia, en la mayoría de aislados, de una IP con el gen *esp*, que codifica una proteína (Esp) de evasión inmune, así como la presencia del gen *hyl* que codifica una hialuronidasa (Hyl). Todo esto sugiere que la adaptación hospitalaria del CC17 se debe a un proceso de múltiples pasos con la adquisición secuencial de genes que proveen al CC17 de ventajas selectivas permitiendo, asimismo, la incorporación de más genes que codifican diversos factores potenciales de virulencia. Esto ha conducido a una subpoblación hospitalaria de *E. faecium* especializada para su supervivencia mediante un proceso de TGH conocido como "capitalismo genético" (100). Experiencias de MLST también han permitido identificar cepas de *E. faecalis* asociadas a complejos clonales de elevada patogenicidad, definidas como subpoblaciones genéticamente diferenciadas y epidemiológicamente asociadas a infecciones hospitalarias, como los CC2 y CC9 (100, 101). Igualmente, experiencias de hibridación genómica comparada (CGH) han permitido observar diferencias génicas en cepas de *E. faecalis*, patógenos y comensales, en las que las patógenas poseen un mayor número de elementos genéticos movilizables que las comensales. La presencia, tanto en las cepas patógenas como comensales de *E. faecalis* de genes que codifican factores potenciales de virulencia sugiere que la patogenicidad de los enterococos puede no deberse a una sola proteína efectora o factor de virulencia sino a la acción concertada de muchas (102). Por ello, es aconsejable que la virulencia de los enterococos como agentes de infecciones nosocomiales severas, su potencial biotecnológico como cultivos iniciadores, protectores y probióticos de los alimentos y su papel como BPEA sean mejor evaluados y conocidos.

8. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LAS BACTERIAS PATÓGENAS EMERGENTES EN LOS ALIMENTOS

Reducir, eliminar o controlar la presencia de BPEA no es fácil si se consideran las posibles vías de contaminación de los alimentos, los factores que influencian su supervivencia y la producción de metabolitos tóxicos, su oculta-

ción intracelular, su evasión del sistema inmune y su virulencia en personas sensibles. Sin embargo, es necesario adoptar estrategias que aseguren la calidad y seguridad de los alimentos desde su producción hasta su consumo (del inglés, "from the field to the fork"). La prevención y control de BPEA durante la producción primaria de alimentos de origen animal y vegetal, así como la adopción por la industria alimentaria de sistemas de prevención y control de la calidad, un mejor manejo higiénico de los alimentos en los hogares y lugares de restauración colectiva, un mayor control de los alimentos destinados a los sectores poblacionales más sensibles y la aplicación de las tecnologías más eficaces de inactivación microbiana deberían ayudar, sin duda, a reducir la incidencia de TIA por BPEA.

Muchas BPEA se encuentran en reservorios animales por lo que la disminución de su presencia podría realizarse mediante la selección genética de animales menos portadores, el uso de vacunas, la utilización de probióticos y la terapia con bacteriófagos y péptidos antimicrobianos o bacteriocinas producidos por bacterias (103, 104). Igualmente, la prevención en los alimentos de la presencia y desarrollo de BPEA puede lograrse mediante la aplicación de tecnologías físicas, químicas, biológicas y el empleo de barreras múltiples. Tecnologías físicas eficaces serían la irradiación, la aplicación de ondas electromagnéticas, la sonicación, los pulsos eléctricos intensos, y el uso de una elevada presión hidrostática, mientras las químicas y biológicas recaen en la utilización de ácidos orgánicos y de agentes antimicrobianos como cultivos protectores o probióticos, bacteriófagos y bacteriocinas (105-107). Otra línea de actuación frente a las BPEA sería la de la protección de los consumidores frente a su actividad patógena mediante el empleo de vacunas, probióticos y alimentos funcionales con péptidos bioactivos de actividad antimicrobiana (108, 109).

El desarrollo de normas legales de prevención y control de la calidad microbiológica de los alimentos también ayudará a la reducción de TIA por BPEA. El Reglamento CE 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, establece Criterios Microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (DOUE, 22-XII-2005) con dos tipos de criterios microbiológicos, unos relativos a la seguridad alimentaria, cuyo incumplimiento supone la no comercialización o retirada de los productos del mercado y, otros, sobre criterios microbiológicos de control del proceso, cuyo incumplimiento requeriría acciones correctoras en el plan APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos). El Reglamento CE 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre (DOUE, 7-XII-2007) modifica, ligeramente, algunos de los criterios de seguridad alimentaria y de higiene de los procesos aplicables a los alimentos clasificados por categorías. No obstan-

te, la legislación actual todavía no considera la aplicación de planes de muestreo, límites de su presencia, métodos analíticos de referencia, fase en la que se aplica el criterio, ni acción en caso de resultados insatisfactorios, para la presencia en los alimentos de BPEA tan significativas como *Campylobacter* spp.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Altekruse, S. F., Cohen, M. L. & Swerdlow, D. L. (1997) Emerging foodborne diseases. *Emerging and Infectious Diseases.* **3:** 285-293.
2. Altekruse, S. F., Swerdlow, D. L. & Wells, S. J. (1998) Factors in the emergence of foodborne diseases. *Veterinary Clinics of North America.* **14:** 1-15.
3. Tauxe, R. V. (2002) Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology.* **78:** 31-41.
4. Marano, N. & Pappaioanou, M. (2004) Historical, new, and reemerging links between human and animal health. *Emerging Infectious Diseases*. **10:** 2065-2066.
5. Orlandi, P. A., Chu, D. T., Bier, J. W. & Jackson, G. J. (2002). Parasites and the food suply. *Scientific Status Summary. Institute of Food Technologists*. Chicago, IL, USA.
6. Koopmans, M. & Duizer, E. (2004) Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*. **90:** 23-41.
7. Montoya, J. G. & Liesenfeld, O. (2004) Toxoplasmosis. *Lancet*. **363:** 1965-1976.
8. Dawson, D. (2005) Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology*. **103:** 207-227.
9. Skovgaard, N. (2007) New trends in emerging pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. **120:** 217-224.
10. Collins, J. E. (1997) Impact of challenging consumer lifestiles on the emergence and reemergence of foodborne pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. **3:** 471-479.
11. Taylor, L. H., Latham, S. M. & Woolhouse, M. E. (2001) Risk factors for human disease emergence. *Phylosophycal Transactions of the Royal Society London B: Biological Sciences*. **356:** 983-989.
12. Doyle, M. P. & Erickson, M. C. (2008) Summer meeting 2007- the problems with fresh produce: an overview. *Journal of Applied Microbiology*. **105:** 317-330.
13. Sivapalasingam, S., Friedman, C. R., Cohen, C. R. & Tauxe, R. V. (2004). Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*. **67:** 2342-2353.

14. Basset, J. & McClure, P. (2008) A risk assessment approach for fresh fruits. *Journal of Applied Microbiology*. **104:** 925-943.

15. Little, C. L. & Gillespie, I. A. (2008) Prepared salads and public health. *Journal of Applied Microbiology*. **105:** 1729-1743.

16. Heaton, J. C. & Jones, K. (2008) Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*. **104:** 613-626.

17. Solomon, E. B., Yaron, S. & Matthews, K. R. (2002) Transmission of *Escherichia coli* 0157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology*. **68:** 397-400.

18. Shaw, R. K., Berger, C. N., Feys, B., Knutton, S., Pallen, M. J. & Fraenkel, G. (2008) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* exploits EspA filaments for attachment to salad leaves. *Applied and Environmental Microbiology*. **74:** 2908-2914.

19. Gourabathini, P., Brandl, M. T., Redding, K. S., Gundersson, J. H. & Berk, S. G. (2008) Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Applied and Environmental Microbiology*. **74:** 2518-2525.

20. Vaerewijck, M. J. M., Sabbe, K., Bare, J. & Houf, K. (2008) Microscopic and molecular studies of the diversity of free-living protozoa in meat-cutting plants. *Applied and Environmental Microbiology*. **74:** 5471-5479.

21. Bleasdale, B., Lott, P. J., Jagannathan, A., Stevens, M. P., Birtles, R. J. & Wigley, P. (2009) The *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system is essential for the survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in free-living amoebae. *Applied and Environmental Microbiology*. **75:** 1793-1795.

22. Morris, J. G. & Potter, M. (1997) Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. *Emerging Infectious Diseases*. **3:** 435-441.

23. Smith, J. L. (1998) Foodborne ilness in the elderly. *Journal of Food Protection*. **61:** 1229-1239.

24. Hutson, A. M., Atmar, R. L. & Estes, M. K. (2004) Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends in Microbiology*. **12:** 279-286.

25. Beck, M. A., Handy, J. & Levander, O. A. (2004) Host nutritional status: the neglected virulence factor. *Trends in Microbiology*. **12:** 417-423.

26. Schaible, U. E. & Kaufmann, S. H. E. (2007) Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLOS Medicine*. **4 (5):** 0806-0812.

27. Ochman, H., Lawrence, J. G. & Groisman, E. A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* **405 (6784):** 299-304.

28. Hacker, J. & Kaper, J. B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Reviews of Microbiology*. **5:** 641-679.

29. Hentschel, U. & Hacker, J. (2001) Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microbes and Infection*. **3:** 545-548.

30. Schmidt, H. & Hensel, M. (2004) Patogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. **17:** 14-56.

31. Juhas, M., van der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W. & Crook, D. W. (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*. **33:** 376-393.

32. Salyeres, A. A., Gupta, A. & Wang, Y. (2004) Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology*. **12:** 412-416.

33. Alonso, A. (2004) Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *International Microbiology*. **7:** 181-191.

34. Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P. J. & Tang, C. M. (2009) Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. **7:** 333-340.

35. Flannagan, R. S., Cosio G. & Grinstein, S. (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology*. **7:** 355-366.

36. Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G. & Finlay, B. B. (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*. **2:** 146-156.

37. Zhang, S., Kingsley, R. A., Santos, R. L., Andrews, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J., Nunes, J., Tsolis, R. M., Adams, L. G. & Baumler, A. J. (2003) Molecular pathogenesis of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infection and Immunity*. **71:** 1-12.

38. Eswarappa, S. M., Janice, J., Nagarajan, A. G., Balasundaram, S. V., Karnam, G., Dixit, N. M. & Chakravortty, D. (2008) Differentially evolved genes of *Salmonella* pathogenicity islands: insights into the mechanism of host specificity in *Salmonella*. *PloS ONE*. **3 (12):** 1-12.

39. McGie, E. J., Brawn, L. C., Hume, P. J., Humphreys, D. & Koronakis, V. (2009) *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Current Opinion in Microbiology*. **12:** 117-124.

40. Tsolis, R. M., Young, G. M., Solnick, J. V. & Baumler, A. J. (2008) Form bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. **6:** 883-892.

41. Hofreuter, D., Tsai, J., Watson, R. O., Novick, V., Altman, B., Benitez, M., Clark, C., Perbost, C., Jarvie, T., Du, L. & Galán, J. E. (2006) Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infection and Immunity*. **74:** 4694-4707.

42. Yuki, N., Susuki, K., Koga, M., Nishimoto, Y., Odaka, M., Hirata, K., Takaguchi, K., Miyatake, T., Furukawa, K., Kobata, T. & Yamada, M. (2004) Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guilian-Barré syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **101:** 11404-11409.

43. Young, K. T., Davis, L. M. & DiRita, V. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Rev. Microbiol*. **5:** 665-679.

44. Humphrey, T., O'Brien, S. & Madsen, M. (2007) Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*. **117:** 237-257.

45. Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wheland. J. & Kreft, J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. **14:** 584-640.

46. Wong, K. K. Y. & Freitag, N. E. (2004) A novel mutation within the central *Listeria monocytogenes* regulator PrfA that results in constitutive expression of virulence gene products. *Journal of Bacteriology*. **186:** 6265-6276.

47. Dussurget, O., Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. (2004) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Reviews Microbiology*. **58:** 587-610.

48. Hamon, M., Bierne, H. & Cossart, P. (2006) *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology*. **4:** 423-435.

49. Gray, M. J., Freitag, N. E. & Boor, K. J. (2006) How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infection and Inmmunity*. **74:** 2503-2512.

50. Scortti, M., Monzó, H, J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D. A. & Váquez-Boland, J. A. (2007) The PrfA virulence regulon. *Microbes and Infection*. **9:** 1196-1207.

51. Cossart, P. & Toledo-Arana, A. (2008) *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes and Infection*. **10:** 1041-1050.

52. Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. **2:** 123-140.

53. Turner, S. M., Scott-Tucker, A., Cooper, L. M. & Henderson, I. R. (2006) Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. **263:** 10-20.

54. Shpigel, N. Y., Elazar, S. & Rosenshine, I. (2008) Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Current Opinions in Microbiology*. **11:** 60-65.

55. Mainil, J. G. & Daube, G. (2005) Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who's? *Journal of Applied Microbiology*. **98:** 1332-1344.

56. Strauch, E., Hammerl, J. A., Konietzny, A., Scheiker-Bekel, S., Arnold, W., Goesmann, A., Pühler, A. & Beutin, L. (2008) Bacteriophage 2851 is a prototype phage for dissemination of the shiga toxin variant gene 2c in *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*. **76:** 5466-5477.

57. Thomson N. R. *et al.* (2006) The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLOS Genetics.* 2(12): 2039-2051.

58. Viboud, G. I. & Bliska, J. B. (2005) *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host signalling responses and pathogenesis. *Annual Reviews Microbiolog.* **59:** 69-89.

59. Heeseman, H., Sing, A. & Trülzsch, K. (2006) *Yersinia's* stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Current Opinion in Microbiology.* 9: 55-61.

60. Trosky, J. E., Liverman, A. D. B. & Orth, K. (2008) *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cellular Microbiology.* 10: 557-565.

61. Matsumoto, H. & Young, G.M. (2009) Translocated effectors of *Yersinia. Current Opinion in Microbiology.* 12: 94-100.

62. Schmid, A., Neumayer, W., Trülzsch, K. et al. (2009) Cross-talk between three secretion system and metabolism in *Yersinia*. *Journal of Biological Chemistry*. **284:** 12165-12177.

63. Bottone, E. J. (1999) *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiological correlates. *Microbes and Infection*. **1:** 323-333.

64. Bhavsar, A. P., Guttman, J. A. & Finlay, B. B. (2007) Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature*. **449:** 827-834.

65. Linsay, J. A. (1997) Chronic sequelae of foodborne diseases. *Emerging Infectious Diseases*. **3:** 443-452.

66. Pallen, M. J. & Wren, B. W. (2007) Bacterial pathogenomics. *Nature*. **449:** 835-842.

67. Freeman, A. F. & Holland, S. M. (2007) Persistent bacterial infections ad primary immune disorders. *Current Opinions in Microbiology*. **10:** 70-75.

68. Vucic, S., Kiernan, M. C. & Cornblath, D. R. (2009) Guillian-Barré syndrome: an update. *Journal of Clinical Neurosciences.* **16:** 733-741.

69. Godschalk, P. C. R., van Belkum, A., van den Braak, N., van Netten, D., Ang, C. W., Jacobs, B. C., Gilbert, M. & Endtz, H. P. (2007) PCR- restriction fragment length polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* genes involved in lipooligosaccharide biosynthesis identifies putative molecular markers for Guillian-Barré syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. **45:** 2316-2320.

70. Heyderman, R. S., Soriani, M. & Hirst, T. R. (2001) Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post-diarrhoeal HUS? *Trends in Microbiology*. **9:** 262-269.

71. Johnson, S. & Taylor, C. M. (2008) What's new in haemolytic uremic syndrome? *European Journal of Pediatrics*. **167:** 965-971.

72. Gangi, E., Kapatral, V., El-Azami, M., Martínez, O. & Prabhakar, B. S. (2004) Characterization of a recombinant *Yersinia enterocolitica* lipoprotein; implications for its role in autoimmune response against thyrotropin receptor. *Autoimmunity*. **37:** 515-520.

73. Brix, T. H., Hansen, P. S., Hegedeus, L. & Wenzel, B. E. (2008) Too early to dismiss *Yersinia enterocolitica* infection in the aetiology of Graves' disease: evidence from a twin case-control study. *Clinical Endocrinology*. **69:** 491-996.

74. Vogenmann, R. & Amieva, M. A. (2007) The role of bacterial pathogens in cancer. *Current Opinion in Microbiology*. **10:** 76-81.

75. Zhang, L., Man, S. M., Day, A. S., Leach, S. T. & Lemberg, D. A. (2009) Detection and isolation of *Campylobacter* species other than *C. jejuni* from children with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*. **47:** 453-455.

76. Naser, S. A., Ghobrial, G., Romero, C. & Valentine, J. F. (2004) Culture of *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet*. **364:** 1039-1044.

77. Mendoza, J. L., Lana, R. & Díaz-Rubio, M. (2009) *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* and its relationship with Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*. **28:** 417-422.

78. Papageorgiou, A. C. & Acharya, K. R. (2000) Microbial superantigens: from structure to function. *Trends in Microbiology*. **8:** 369-375.

79. Eppinger, M., Rosovitz, M. J., Fricke, W. F., Rasko, D. A., Kokorina, G., Fayolle, C., Lindler, L. E., Carniel, E. & Ravel, J. (2007) The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of far east scarlet-like fever. *PLOS Genetics*. **3:** 1508-1545.

80. Fraser, J. D. & Proft, T. (2008) The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunology Reviews*. **225:** 226-243.

81. Lan, Z., Fielder, F. & Kathariou, S. (2000) A sheep in wolf's clothing: *Listeria innocua* strains with teichoic acid-associated surface antigens and genes characteristic of *Listeria monocytogenes* serogroup 4. *Journal of Bacteriology*. **182:** 6161-6168.

82. Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D. et al. (2009) The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature*. **459:** 950-956.

83. Manges, A. R., Tabor, H., Tellis, P., Vincent, C. & Tellier, P. P. (2008) Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause urinary tract infections. *Emerging Infectious Diseases*. **14:** 1575-1583.

84. Lloyd, A. L., Henderson, T. A., Vigil, P. D. & Mobley, H. L. (2009) Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contributes to virulence. *Journal of Bacteriology*. **191:** 3469-3481.

85. Peigne, C., Bidet, P., Mahjoub, F., Plainvert, C., Barbe, V., Medigué, C., Frapy, E., Nassif, X., Denamour, E., Bingen, E. & Bonacorsi, S. (2009) The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteriemia in a neonatal rat meningitis model. *Infection and Immunity*. **77:** 2272-2284.

86. Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Johnson, S. J., Stell, A. L., Doetkott, C., Johnson, J. R., Kim, K. S., Spanjaard, L. & Nolan, L. K. (2008) Comparaison of extraintestinal *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveal a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. **74:** 7043-7050.

87. Azevedo, N. F., Almeida, C., Fernandes, I., Cerqueira, L., Dias, S., Keevil, C. W. & Vieira, M. J. (2008) Survival of gastric and enterohepatic *Helicobacter* spp. in water: implications for transmission. *Applied and Environmental Microbiology*. **74:** 1805-1811.

88. Ceelen, L. M., Decostere, A., Chiers, K., Ducatelle, R., Maes, D. & Haesebrouck, F. (2007) Pathogenesis of *Hellicobacter pullorum* infections in broilers. *International Journal of Food Microbiology*. **116:** 207-213.

89. Tauxe, R. V. (2004) Salad and pseudoapendicitis: *Yersinia pseudotuberculosis* as a foodborne pathogen. *Journal of Infectious Diseases*. **189:** 761-763.

90. Laukkanen, R., Ortiz, P., Siekkinen, K. M., Ranta, J., Maijala, R. & Korkeala, H. (2008) Transmission of *Yersinia pseudotuberculosis* in the pork production chain from farm to slaughterhouse. *Applied and Environmental Microbiology*. **74:** 5444-5450.

91. Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A. & Gaastra, W. (2006) *Arcobacter*, what is known about a potential foodborne pathogenic agent. *Veterinary Microbiology*. **115:** 1-13.

92. Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L. & Wösten, M. M. S. M. (2007) The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLOS One*. **12:** 1-21.

93. MacLean, L. L., Pagotto, F., Farber, J. M. & Perry, M. B. (2009) The structure of the O-antigen in the endotoxin of the emerging food pathogen *Cronobacter* (*Enterobacter*) *muytjensii* strain 3270. *Carbohydrate Research*. **344:** 667-671.

94. El-Sharoud, W. M., O'Brien, S., Negredo, C., Iversen, C., Fleming, S. & Healy, B. (2009) Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiology*. **9:** 24-33.

95. Townsend, S. M., Hurrell, E., Caubilla-Barron, J., Loc-Carrillo, C. & Forsythe, S. (2008) Characterization of an extended-spectrum beta-lactamase *Enterobacter hormaechei* nosocomial outbreak and other *Enterobacter hormaechei* misidentified as *Chronobacter (Enterobacter) sakazakii. Microbiology.* 154: 3659-3667.

96. Isonhood, J. H. & Drake, M. (2002) *Aeromonas* species in foods. *Journal of Food Protection*. **65:** 575-582.

97. Lamy, B., Kodjo, A., The colBVH Study Group & Laurent, F. (2009) Perspective nationwide study of *Aeromonas* infections in France. *Journal of Clinical Microbiology*. **47:** 1234-1237.

98. Buckwold, S. L., Shoemaker, N. B., Sears, C. L. & Franco, A. A. (2007) Identification and characterization of conjugative transposons CTn86 and CTn93 in *Bacteroides fragilis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **73:** 53-63.

99. Rhee, K.-J., Wu, S., Wu, X., Huso, D. L., Karim, B., Franco, A. A. & Rabizadeh, S. (2009) Induction of persistent colitis by a human comensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice. *Infection and Immunity*. **77:** 1708-1718.

100. Leavis, H. L., Bonten, M. J. M. & Willems, R. J. L. (2006) Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dipersion and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*. **9:** 454-460.

101. Kawalec, M., Pietras, Z., Danilowicz, E., Jakubzack, A., Gniadkowski, M., Hryniewicz, W. & Willems, R. J. (2007) Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones. *Journal of Clinical Microbiology*. **45:** 147-153.

102. Solheim, M., Aakra, A., Snipen, L. G., Brede, D. A. & Nes, I. F. (2009) Comparative genomics of *Enterococcus faecalis* from healthy Norwegian infants. *BMC Genomics*. **10:** 194-205.

103. Boysen, L. & Rosenquist, H. (2009) Reduction of thermotolerant *Campylobacter* species on broiler carcasses following physical decontamination at slaughter. *Journal of Food Protection*. **72:** 497-502.

104. Rozema, E. A., Stephens, T. P., Bach, S. J., Okine, E. K., Johnson, R. P., Stanford, K. & McAllister, T. A. (2009) Oral and rectal administration of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Journal of Food Protection*. **72:** 241-250.

105. Dincer, A. H. & Baysal, T. (2004) Decontamination techniques for pathogenic bacteria in meat and poultry. *Critical Reviews Microbiology*. **30:** 197-204.

106. Zhao, T., Podtburg, T. C., Zhao, P., Schmidt, B. E., Baker, D. A., Cords, B. & Doyle, M. P. (2006) Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. *Applied and Environmental Microbiology*. **72:** 3314-3320.

107. Guenther, S., Huwlyler, D., Richard, S. & Loessner, M. (2009) Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and Environmental Microbiology*. **75:** 93-100.

108. Hayes, M., Barret, E., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Hill, C. & Stanton, C. (2009) Evaluation of an antimicrobial ingredient prepared from a *Lactobacillus acidophilus* casein fermentate against *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Food Protection*. **72:** 340-346.

109. Hunther, C. J., Williams, M., Petrosyan, M., Guner, Y., Mittal, R. & Mock, D. (2009) *Lactobacillus bulgaricus* prevents intestinal epithelial cell injury caused by *Enterobacter sakazakii*-induced nitric oxide both in vitro and in the newborn rat model of necrotzing enterocolitis. *Infection and Immunity*. **77:** 1031-1043.

7. Listeriosis. Una zoonosis emergente de transmisión alimentaria

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA

Académico de Numero de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Catedrático Emérito de la Universidad San Pablo

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas tres décadas la listeriosis se ha convertido en los países desarrollados en una de las principales zoonosis emergentes de transmisión alimentaria. Los casos y brotes humanos de esta enfermedad se han asociado a la ingestión de alimentos muy diversos, como leche, queso, fiambres, patés, salchichas de tipo Francfort, mortadelas y similares, filetes empanados, pechugas rebozadas, gelatinas de recubrimiento y alimentos vegetales crudos y aderezados con distintas clases de salsas.

El primer caso humano descrito lo presentó un soldado en la I Guerra Mundial, si bien Gray y Killinger (1) en su ya clásica revisión sobre *Listeria monocytogenes* señalan que se conocen descripciones de esta bacteria desde finales del siglo XIX. Desde el caso citado y hasta 1950, se declararon esporádicamente algunos casos más, pero actualmente llegan a los 2.500-3.000 casos con una tasa de muertes de 500 personas/año (2).

La listeriosis es una enfermedad atípica, de origen alimentario, cuyo interés en salud pública deriva de alta letalidad (20-30% casos) que corrientemente afecta a inmunodeprimidos, con enfermedades subyacentes (SIDA, por ejemplo) que causan un deterioro manifiesto en la inmunidad mediada por linfocitos T.

Las listerias son microorganismos ubicuos que sobreviven mucho tiempo en los alimentos, suelo arable, excretas animales, cultivos de huerta y en el agua,

de aquí que constituyan una gran preocupación para la industria agroalimentaria. La gravedad y alta letalidad de la listeriosis humana exigen un control higiénico estricto, pero las características de su agente etiológico son tales que resulta irreal pretender que absolutamente todos los alimentos estén exentos de *L. monocytogenes* (3). Esta situación ha originado un vivo debate y afortunadamente también ha estimulado e impulsado las investigaciones sobre la listeriosis y su agente causal.

2. HISTORIA

El primer aislamiento y descripción del agente responsable de una infección listeriósica, que causó muchas muertes en conejos y cobayas, se realizó hace 83 años. Se trataba de un bacilo corto, Gram positivo, no esporulado, que infectaba los monocitos sanguíneos, por lo que se denominó *Bacterium monocytogenes* (4). A finales del siglo XIX ya se habían descrito microorganismos (1) que afectaron a personas y animales. En 1930 se aisló una bacteria parecida del hígado de unos jerbos enfermos, que se llamó *Listerella hepatolytica*, en recuerdo homenaje del médico británico Sir Joseph Lister (1827-1912), quien en 1867 estableció las bases de la antisepsia en Cirugía, lo que permitió intervenciones quirúrgicas "limpias". Sin embargo, como el nombre del género *Listerella* ya se había aplicado a un género de mohos productor de mucílago se cambió, lo mismo que el de la especie, por *Listeria monocytogenes* (5).

De las seis especies que comprende este género, solo son patógenas la *L. monocytogenes* y la *L. ivanovii*, que afecta principalmente a los animales. Las otras cuatro, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayi* (sin. *murrayi*) son inocuas para la especie humana y para los animales (3). Hasta ahora se han descrito infecciones debidas a *L. monocytogenes* en una gran variedad de especies animales (vacas, ovejas, cobayas, conejos, jerbos y otros roedores, aves y peces), y también en la especie humana. Desde 1980 se han declarado y estudiado en Europa y América del Norte al menos cinco brotes de listeriosis debidos a la ingestión de alimentos (6). El primero ocurrió en Canadá y afectó a 34 recién nacidos y a 7 adultos, con una letalidad mayor del 28%. Pruebas epidemiológicas y cultivos bacterianos demostraron que en los adultos se debía a la ingestión de coles cultivadas en un campo abonado con estiércol de un rebaño de ovejas, varias de las cuales habían muerto de listeriosis.

En 1979 tuvo lugar un brote en Boston (EE.UU.) que afectó a 20 pacientes adultos de 8 hospitales (7). Aunque el alimento implicado no se estableció

analíticamente, todos los enfermos habían ingerido hortalizas crudas. En un brote posterior (Massachussetts, 1983) se vieron implicados 42 adultos y 2 bebés. Hubo 14 fallecimientos y la infección se atribuyó a la ingestión de leche pasteurizada de una granja, algunas de cuyas vacas padecían listeriosis. Aunque no se demostró fallo alguno en el proceso de pasteurización, quedó la duda de si *L. monocytogenes* resistió las temperaturas y tiempos de la pasteurización comercial de la leche.

Por último, el brote de California de 1985, que afectó a 93 bebés y a 49 adultos, muriendo 48 enfermos, alertó al mundo científico que se dispuso a investigar el rol que desempeñaban los alimentos en la difusión de la listeriosis. La cepa de *L. monocytogenes* responsable de este brote se aisló, en un queso blanco mejicano y en la fábrica donde se elaboró. El brote cesó cuando se retiró del mercado todo el lote de queso al que pertenecía el queso causante (8). En Europa un brote que duró de 1983 a 1987, afectó a 122 personas, la mitad de ellas eran bebés; se produjeron 31 fallecimientos se debió a un queso blando, del tipo del vacherin francés, cuya retirada del mercado terminó con el brote (9). De marzo a diciembre de 1992 se produjeron 279 casos de listeriosis humana en casi toda Francia, falleciendo 63 pacientes y abortando 32 mujeres embarazadas. El alimento responsable fue una conserva de lengua de cerdo recubierta de gelatina, de la que se aisló *L. monocytogenes* del serotipo 4b (10).

3. MICROBIOLOGÍA

3.1. Datos básicos

Las listerias son bacilos cortos, Gram positivos, catalasa positivos, anaerobios facultativos o microaerófilos. En ciertas ocasiones, poco frecuentes, originan formas cocoides separadas entre sí. Son móviles a 25 ºC e inmóviles a temperatuas de 35 ºC o mayores. Se mueven por flagelos cuyo componente principal es la proteína flagelina; los antígenos flagelares se conocen como antígenos H y los codifica el gen fla A cuya expresión es dosis-dependiente respecto de los factores medioambientales, generalmente alimentos, que contienen represores de la expresión del gen fla A. En algunas cepas los flagelos influyen en la adhesividad de las listerias al poliestireno, propiedad de gran interés práctico en la industria alimentaria (14). Las especies de *Listeria* se identifican basándose en sus características bioquímicas (producción de ácido a partir de D-xilosa, L-ramnosa, α-metil-D-manósido y D-manitol) y en las culturales (2, 3, 11). En la Tabla

Tabla 1. *Límites de crecimiento de Listeria monocytogenes (ICMSF, 1996).*

	Mínimo	**Óptimo**	**Máximo**
Temperatura (ºC)	-0,4	37	45
pH	4,39	7,0	9,4
Actividad de agua (aw)	0,92	—	—

Referencia 11: ICMSF (International Commission on Mircrobiological Specifications for Foods).

1 se muestran los límites de crecimiento de *L. monocytogenes* y en la Tabla 2 sus diferencias con otras especies. Otro detalle diferencial que distingue entre las especies no patógenos y *L. monocytogenes* es la capacidad de esta última de lisar los glóbulos rojos sanguíneos (3).

3.2. Identificación y tipificación

Cuando se investigan los brotes de listeriosis, los aislamientos de *L. monocytogenes* suelen caracterizarse más allá del nivel de especie, lo mismo que para ayudar a identificar las fuentes comunes de microorganismos, lo que se realiza con técnicas de huellas genéticas y de serotipificiación molecular, incluida la electroforesis de las enzimas multiloculares (12, 13). El 95% de los aislamientos de víctimas de listeriosis pertenecen a los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b. Los CDC (Centros de Control y Prevención de Enfermedades de los EE.UU.) han establecido una red de laboratorios (los *PulseNet*) para subtipificar las bacterias patógenas usando métodos estandarizados de electroforesis en gel en campos pulsados (PFGE), que emplean corrientes eléctricas alternas para aumentar la resolución de las huellas genéticas. Comparando en Internet, los patrones de PFGE de los microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos y procedentes de localidades distintas se pueden identificar los brotes que tienen un mismo origen.

La deleción y las mutaciones del flaA, suprimen la movilidad bacteriana. La guanina y la citosina constituyen el 36 al 42% de sus nucleótidos. Con *microarrays* (microherramientas) se han identificado 126 genes reguladores de la fase exponencial del crecimiento y 670 que lo hacen en la fase estacionaria. Lo más relevante del genoma, es la familia de genes codificadores de peptidilarginina desiminasa, que se expresan mejor en anaerobiosis y a pH bajo, lo que permite a la bacteria tolerar los ácidos orgánicos y un pH bajo.

TABLA 2. *Diferencias entre L. monocytogenes y otras especies del género Listeria (ICMSF, 1996).*

Especie de *Listeria*	Fermentación de carbohidratos			Prueba de CAMP		Hemólisis β
	Manitol	L-Ramnosa	D-xilosa	SA	RE	
monocytogenes	-	+	-	+	-	+
innocua	-	+/-	-	-	-	-
welshimeri	-	+/-	+	-	-	-
seeligeri	-	-	+	+	-	+
ivanovii	-	-	+	-	+	+
grayi (murrayi)	+	+/-	-	-	-	-

Notas: 1. La prueba de CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) consiste en la aparición de una zona β-hemolítica típica en placas de agar sangre al sembrarlas en estría con L. monocytogenes, junto con *Staphylococcus aureus (SA) y/o Rhodococcus equi* (RE) e incubarlas 36-48 horas a 37 ºC.

Las especies se identifican por hibridación de los ADN, por las secuencias del ARNr de 16S, por los enzimas multiloculares y por PCR multiplex. Como ya se ha dicho las especies patógenas son la *L. monocytogenes* hemolítica y la *L. ivanovii.* Ésta se adhiere e invade específicamente a las células WISH, derivadas de células amnióticas humanas, lisa la membrana del fagosoma, polimeriza la actina de la célula huésped, y puede extenderse de célula a célula con más eficiencia, siendo capaz de infectar al hombre y a los animales, aunque su supervivencia en las células WISH es menor que la de la *L. monocytogenes*; como la subespecie *londoniensis* pertenecen a la estirpe I. En la estirpe II se incluyen las poco invasoras o apatógenas *L. welshimeri, L. seeligeri* y *L. grayi* (*L. murrayi*). En la estirpe III no hay especies patógenas. De las seis especies, solo *L. monocytogenes* constituye un problema sanitario, aunque es posible que otras especies consideradas apatógenas, como la muy extendida *L. innocua* no hemolítica, puedan infectar a organismos muy susceptibles; la misma *L. monocytogenes* es, en cierta medida, oportunística.

3.3. Subtipado, genómica y serovares

El subtipado molecular de la *L. monocytogenes* puso de manifiesto cuatro líneas a las que preferimos llamar estirpes, clones epidémicos o complejos clonales; son los llamados, EC I a IV, que más tarde se ampliaron a siete. En la

mayoría de las áreas geográficas, el 65% de las cepas son de la estirpe ECII, distinguible fácilmente de los otros EC. El 95% de las listeriosis humanas, esporádicas o de brotes se deben a los serovares, 1/2, 1/2a, 1/2b, 3b y sobre todo el 4b; solo el 5% corresponde a los serovares 1/2a, 1/2c, 4d, 3a y una fracción indiciaria a los otros 8 serovares de los cuales un 35% son ECI. El serovar 4b causa casi la mitad de las listeriosis humanas, siendo relativamente escaso su aislamiento en los alimentos.

Orsi *et al.* (16) secuenciaron los genomas de cuatro cepas de *L. monocytogenes* que correspondían a la estirpe I y a una cepa de *L. innocua* como patrón de la estirpe II. Entre los muchos tipos de ARN del operón de la *L. monocytogenes*, al menos 2 de los 50 con menos de 500 nucleótidos, intervienen en la virulencia para el ratón. Analizando la transcripción del genoma de *L. monocytogenes* se obtuvo un mapa completo del operón de la listeria y se descubrieron varios ARN anti sentido.

Las cepas de la especie *L. monocytogenes* se pueden identificar por su biotipo, tipo molecular y sobre todo por su serotipo, determinado por el método de Seeliger en el que se identifican 13 serovares o serovariedades y seguramente otros aún desconocidos. Hay serovares atípicos como el 4b que aislaron Vasconcelos y colaboradores (17) en el líquido cefalorraquídeo de un prematuro, que solo daba una banda de 691 pb con la técnica de la PCR-Multiplex. El 54%, de los 150 casos declarados en Austria entre 1997 y 2007 eran serovares 4b; el 31,3% pertenecían al 1/2; el 10% al 1/2b; el 2,7% al 1/2c; el 1,3% al 4d y el 0,7% al 4d (17).

3.4. Diferenciación de cepas

Dentro de cada serovar, se pueden diferenciar las cepas por fagotipado, por electroforesis de proteínas, o por la técnica de los enzimas multiloculares, que separa la *L. monocytogenes* en dos grupos, uno que comprende los serovares 4b y los l/2b de origen humano, y el otro con los serovares 1/2, procedentes de los alimentos y del ambiente (13, 18), o la electroforesis en gel del ADN en campo pulsado, para subtipar cepas (PFGE), que separa las grandes moléculas de AND por medio de un campo eléctrico alterno, más resolutivo que la electroforesis en gel de agarosa. El pulsotipado permitió a Garrido *et al*. (19) adscribir 33 cepas aisladas de 40 enfermos hospitalizados en Navarra a 20 pulsotipos, técnica que en tres ocasiones permitió integrar casos esporádicos en un brote, aunque no pudieron incriminar al alimento responsable.

También son importantes el método del perfil de micro y macrorrestricción, con enzimas de incisión y la ampliación del ADN polimórfico (13). La huella genética por PCR y el polimorfismo del gen actA permitieron a Bania *et al*. (20) incluir al 61% de 36 cepas aisladas de alimentos y a 13 procedentes de enfermos, en la estirpe I, y al 3,1% en la estirpe II. La técnica de la huella genética por PCR discrimina más que el polimorfismo del gen actA.

En un estudio italiano realizado entre 2002 y 2005, se obtuvieron 674 aislamientos de *L. monocytogenes* a partir de enfermos humanos, 558 de alimentos diversos y 59 de muestras del ambiente. Se comprobó que había 11 serotipos que aparecían en los aislamientos de los tres orígenes (21). Los serotipos predominantes fueron los siguientes: 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b.

Incorporando sondas a PCR multiplex se han establecido, los genes inlA, inlC e inlJ que permiten determinar rápidamente la especie y la virulencia de las listerias. Liu *et al*. (22) identificaron con sondas inlA, a 36 cepas de *L. monocytogenes*, amplificando un fragmento de 800 pb y establecieron la virulencia en un fragmento de 517 pb y con sondas inlC e inlJ en fragmentos de 238 pb detectaron a las cepas patógenas de *L. monocytogenes*, con virulencia relativa de 30-100%, capaces de matar a ratones A/J inoculados intraperitonealmente mientras que daban resultados negativos con las cepas naturalnente apatógenas, con una virulencia relativa del 0%. No se emplean sondas con el gen inlB que permitirían reconocer características de especie, ya que no reconocen a las cepas de los serotipos 4a-e.

3.5. Filogenia

Las listerias proceden de un ancestro común, dotado del gen PAIs, se trata, probablemente de un saprofito con excepcionales aptitudes para supervivir. Probablemente las estirpes II y I proceden de la III, sin descartar que simultáneamente ocurra lo contrario y que algunas listeriosis saprofitas procedan de las patógenas. Así las listerias *innocua y welshimeri* surgieron al perderse o alterarse su LIPI-1. Curiosamente, la especie apatógena *Listeria innocua* exhibe los mismos patrones de genes relacionados con la virulencia, mientras que carece de varios ARN no codificadores.

La distribución filogenética de los serotipos indica que el serotipo 4b evolucionó a partir del 1/2b, el antepasado probable de la estirpe I. El serotipo 1/2c derivó del 1/2a, siendo un paso intermedio la cepa EGDe (1/2a). El factor de virulencia internalinaA (InlA) evolucionó por recombinación localizada produ-

ciendo un mosaico con evolución convergente, lo que indica una selección natural hacia una InlA truncada.

3.6. Cultivos e inoculaciones

Al ser un parásito celular, *L. monocytogenes* crece en muchos tipos de células en cultivo primario o de serie, como los fibroblastos, los hepatocitos Caco-2 y HepG2, las HBMEC procedentes de las células endoteliales de los capilares del cerebro humano y en las células epiteliales del intestino humano. Para que se desarrollen en medios sin células le deben enriquecer, como la infusión de corazón y cerebro o el medio de Omarova de aislamiento de listerias de muestras muy contaminadas como las obstétricas.

La inoculación de bacterias a diversas especies animales es un método microbiológico clásico. En el caso de *L. monocytogenes* se emplean casi siempre roedores, como el cobaya, el jerbilo o rata del desierto (*Gerbillus gerbillus*) y sobre todo ratones silvestres o modificados genéticamente por técnicas *knock-out* y *knock-in*, ya que los factores que median la invasión celular son específicos de especie. La *L. monocytogenes* se desarrolla en la membrana corioalantoidea y en saco vitelino del embrión de pollo. El pez cebra, *Danio rerio*, es un modelo útil y cómodo para estudiar muchas bacterias, entre ellas las listerias, ya que en los fagocitos de sus formas embrionaria y larvaria, pueden vivir y multiplicarse, siendo ópticamente accesibles, cuando el sistema inmune innato es ya efectivo. La inyección intravenosa de *L. monocytogenes* en las larvas causa una progresiva y letal infección, en la que las listerias son fagocitadas por los macrófagos y por los granulocitos (29). La inoculación de la *L. monocytogenes* puede hacerse por vía oral o digestiva (mimetizando la infección natural), por las vías respiratorias (con aerosoles o por sonda traqueal), peritoneal e intravenosa con lo que se soslaya la barrera gastrointestinal, que requiere la interacción de la InlA-E-caderina.

En Bélgica hay un Centro de referencia de Listerias, que identifica las cepas que se les envía.

4. INCIDENCIA

La listeriosis es una enfermedad rara, de la que se declaran anualmente en el mundo varios miles de casos, que solo representan una fracción de los

diagnosticados, que, a su vez, son una mínima parte de los casos reales. La incidencia, referida al millón de habitantes es en Europa, y en América del Norte es de 2 a 7. En España se han efectuado pocos estudios epidemiológicos, no obstante, Garrido *et al.* (19) registraron los datos de 40 enfermos hospitalizados en Navarra entre 1995 y 2005 (13 eran mujeres gestantes); su incidencia anual fue de 1,8 a 11,8 (media 6,8), aumentando en los tres últimos años.

La incidencia depende mucho de cómo y dónde se hizo la declaración, ya que difiere si se hace en la comunidad o en los hospitales, así como de la cultura sanitaria del país y su población, de la gravedad de cada caso, del criterio diagnóstico, de si se hace por vigilancia o por médicos centinela, etc. La baja incidencia de casos reales que al parecer tienen los países subdesarrollados se achaca al escaso desarrollo de la industria del frío y probablemente a no disponer de técnicas de diagnóstico etiológico.

La incidencia real depende fundamentalmente de la cantidad de alimentos conservados y listos para el consumo que se ingieran, de las técnicas y modo de procesar los alimentos y de las medidas de higiene tomadas en la industria alimentaria. Son muchos los factores que influyen en el aumento de casos de listeriosis y de otras enfermedades emergentes de transmisión alimentaria, entre los cuales tenemos:

- La inhibición y destrucción de los microorganismos alterantes de los alimentos bajo la acción de las tecnologías de conservación alimentaria. *L. monocytogenes*, que es un mal competidor, crece bien, sin embargo, a temperaturas de refrigeración, condición en la que no se desarrolla la flora bacteriana antagonista.
- La tendencia a fusionarse de las empresas agroalimentarias ha dado lugar a grandes plantas industriales centralizadas que deben extremar la vigilancia y control sanitario ya que cualquier fallo en seguridad y la calidad higiénica alcanza a un número de poblaciones y consumidores mucho mayor que antes de la fusión industrial.
- Los cambios demográficos de los países industrializados —que cuentan con un buen aporte alimentario y una medicina avanzada— han propiciado, un aumento de los grupos de riesgo (ancianos, inmunodeprimidos, enfermos de SIDA, pacientes de transplantes, de tratamientos anticancerígenos, etc.). *L. monocytogenes*, al ser un buen oportunista, ataca preferentemente a estos grupos de riesgo (sujetos débiles y con bajas defensas).

- La gran importancia de la refrigeración en la conservación, transporte y distribución de alimentos, favorece a *L. monocytogenes* por crecer mejor a temperaturas frías que son letales para sus microorganismos competidores.
- La tendencia creciente al consumo de alimentos mínimamente procesados y sin conservantes obliga igualmente a mantenener una higiene óptima, meta ocasionalmente difícil de alcanzar.
- Las demandas de asociaciones de consumidores que exigen disponer de alimentos microbiológicamente seguros y de gran calidad, contar con métodos sensibles y fiables para la detección de brotes esporádicos y la disponibilidad de bases de datos computerizadas, huellas genéticas e Internet han permitido poner de manifiesto brotes y casos que hace algunos años habrían pasado desapercibidos.

El sistema de "cáterin" que centraliza la compra, preparación y distribución de alimentos fríos o precocinados, para atender a los pasajeros de aviones, barcos, autobuses, hospitales, centros escolares, comedores de empresas, etc., facilita y abarata los alimentos, pero puede extender las infecciones alimentarias incluso en personas muy alejadas entre sí territorialmente. En Mayo de 2003, dos pacientes adultos de un Servicio Oncológico de un Hospital inglés padecieron listeriosis causada por la misma cepa de *L. monocytogenes*, que había contaminado también a unos sandwiches preparados en un cáterin, que suministraba alimentos a otros hospitales en los que causó pequeños brotes (24).

5. RESERVORIOS Y FUENTES

Son numerosas las especies animales domésticas y silvestres que sirven de rervorio y sus heces de fuente de infección de listerias.

La repercusión clínica, así como la carga de listerias en los animales, varía mucho entre las diferentes especies y dentro de cada una hay diferencias indivuales atribuibles a la inmunidad antibacteriana. Al igual que en la especie humana la afectación del SNC en los animales es muy relevante y como en el hombre puede causar romboencefalitis. Se ha visto, basándose en más de 200 casos de listeriosis en bovinos, ovinos y caprinos que la *L. monocytogenes* llega al SNC migrando por los axones del trigémino y de otros pares craneales. La consiguiente encefalitis se extiende a las regiones del cerebro rostral verosímilmente por migración axonal intracerebral.

Esteban *et al*. (25) aislaron en Vascongadas, una región con numerosos rebaños y granjas de rumiantes, *L. monocytogenes* en el 46,3% de las vacas lecheras, en el 30,6% de los vacunos de carne y en el 14,2% de los rebaños de ovejas, sin encontrar las listerias en ninguna de las 17 explotaciones porcinas estudiadas. El examen individual de los animales demostró que el 1,50% de 197 ovejas albergaba *L. monocytogenes*, lo mismo que el 21,3% de 221 bovinos. Al serotipar 114 cepas se demostró que el 84,2%, eran del complejo 4b, seguido por el 13,2% del 1/2.

En los rumiantes domésticos enfermos la *L. monocytogenes* se transmite, lo mismo que en las llamas y alpacas, por portadores intestinales. En los piensos, incluidos los ensilados, se han encontrado hasta $l0^5$ ufc por g.

La *L. monocytogenes* puede permanecer mucho tiempo viable acantonada en focos dispersos especialmente en la médula ósea. Hardy *et al*. (26) usando la bioluminiscencia encontraron en ratones inoculados, muchos focos listeriósicos pequeños, que no llegaban a formar granulomas ni infiltrados. Incluso las mutantes hly, altamente atenuadas, y con defectos de replicación intracelular pueden hacerlo durante varias semanas en los focos medulares. Skovgaard *et al*. (27) encontraron que el 24% de las muestras de carne de cerdo y de ganglios retrofaríngeos de bóvinos tenían *L. monocytogenes.*

En cuanto a otros animales se sabe que en Yugoslavia, el 45% de los cerdos sacrificados tenía *Listeria monocytogenes* en sus tonsilas. Los pollos de tipo broiler también estaban contaminados en el 60% de las muestras. Dutta *et al*. (28) atribuyeron a pavos infectados la probable contaminación de locales. Los pavos estresados por el frío padecen una infección transitoria, con colonización del hígado y de los tejidos sinoviales de la rodilla, la inoculación oral o respiratoria de la cepa Scott A tienen menor letalidad.

Fuentes humanas. Los enfermos con gastroenteritis listeriósica rara vez sirven de fuente aunque el 21%, de las excretas de los enfermos tengan 10^4 ufc/g, y el 18% de las personas que conviven con los enfermos excreten el mismo serovar de *L. monocytogenes* y del mismo perfil isoenzimático. Se han presentado algunos casos en convivientes, incluso en hospitalizados, que podrían deberse al mismo alimento. En todo caso es difícil o imposible señalar el caso índice (28). En España Gómez Mampaso en 1993 atribuyó a los adultos el 18%, para los varones y el 31% para las mujeres embarazadas, que llegó al 75% en las madres de niños listeriósicos.

Los enfermos y los portadores pueden contaminar el ambiente y a su vez contaminarse de éste.

El líquido amniótico puede contener unas 10^8 ufc/ml, que pueden contaminar paritorios, maternidades y todo el material, si no se limpia y desinfecta a fondo. Mascola *et al*. (28) demostraron en California que un brote, se habría debido a portadores fecales. *L. monocytogenes* se ha aislado de las secreciones cervicovaginales de puérperas, pero su papel transmisor es mínimo y, hasta ahora, no se ha encontrado *L. monocytogenes* en las secreciones orofaríngeas de personas sanas.

En los veterinarios y ganaderos se producen listeriosis cutáneas al atender el parto de vacas preñadas infectadas, por ello debiera reconocerse como una enfermedad profesional.

6. LISTERIOSIS Y ALIMENTOS

6.1. Alimentos listos para comer

Los alimentos que no requieren tratamiento culinario alguno antes de ingerirse (quesos, salami, salchichas Francfurt, patés, etc.) constituyen un alto riesgo de contaminación listeriósica para ciertas industrias alimentarias y para los productos que fabrican (2, 29, 30). Dada su naturaleza estos productos deben mantenerse siempre bajo condiciones de frío (2-4 ºC) hasta el momento de su consumo. Se ha visto en varias ocasiones que el 20-25% de los frigoríficos domésticos presentan temperaturas ≥ de 10 ºC, con lo que los alimentos que contienen no alcanzan temperaturas de refrigeración en su punto de enfríamiento más tardío. Por tanto, la refrigeración doméstica proporciona un ambiente donde *L. monocytogenes* compite, con éxito, contra los microorganismos mesófilos antagonistas (31).

6.2. Productos lácteos

La leche cruda es una fuente de *L. monocytogenes* a juzgar por el 2.5% de muestras de tanques de refrigeración que contienen esta bacteria (29). La pasteurización de la leche es el mejor método de higienización de la misma, junto con el procesado UHT, el más utilizado en la actualidad. Sin embargo, como la leche pasteurizada constituye un buen sustrato para el crecimiento de *L. monocytogenes* y dado que para conservarla debe mantenerse a temperaturas de refrigeración, según hemos señalado, si ocurriera algún fallo en el proceso (por

ejemplo, cierres defectuosos, tapas desplazadas, fisuras, etc.) podría contaminarse con listerias del ambiente, lo que acarrearía un gran aumento de su recuento que, solo en una semana de conservada a 6-7 ºC, alcanzaría las 10^8 ufc/ml (32).

En los quesos elaborados con leche con listerias viables, la *L. monocytogenes* sobrevive al proceso de elaboración por su resistencia al calor (hasta 40-45 ºC), al frío (4-6 ºC) y por su tolerancia a la sal. Durante la coagulación de la leche, las bacterias se concentran en la cuajada y dependiendo del tipo de queso, unas veces crecen (queso feta), otras se destruyen (queso cottage), en ocasiones desaparecen poco a poco (queso cheddar), otras crecen bien (camembert) y ocasionalmente su número disminuye rápidamente al madurar y luego se estabiliza (quesos azules). Las razones de este comportamiento se desconocen todavía (34). En las personas susceptibles a *L. monocytogenes* la ingestión de algunos quesos blandos es un factor de riesgo de padecer listeriosis.

6.3. Productos cárnicos

La contaminación de la carne y sus productos con *L. monocytogenes* se ha puesto de manifiesto en numerosas ocasiones (27, 33) tanto en canales enteras, como despiezadas y lo mismo en las de rumiantes que en las de cerdos y aves. Entre los productos cárnicos más frecuentemente contaminados con *L. monocytogenes* destacan los siguientes: carne picada, pasta de salami, salchichas de pavo, mortadelas y otros fiambres. La contaminación más frecuente es la superficial, especialmente a nivel de matadero. La carne cruda picada y el paté figuran entre los productos cárnicos con mayor porcentaje de contaminación, que va desde menos del 1% hasta el 70%.

El desarrollo de *L. monocytogenes* en los productos cárnicos depende del pH, tipo de carne (magra o grasa), tipo y cantidad de microflora originaria, temperatura a la que han estado expuestas y presencia o ausencia de conservantes (35).

Las canales de aves (pollo tipo *broiler*, listo para comer, precocinado y refrigerado o congelado) suelen estar contaminadas y en ocasiones hasta el 60% de las muestras han resultado positivas (36). De todos modos los recuentos de *L. monocytogenes* de los productos cárnicos del comercio suelen ser bajos. El 80 al 90% de las muestras analizadas mostraban, desde menos de 10, hasta 100 ufc/ml. No obstante, en algunos productos cárnicos, listos para comer, e implicados en brotes de listeriosis se han señalado recuentos de listerias mucho mayores, hasta 10^9 ufc/ml.

6.4. Pescados y mariscos

Listeria monocytogenes ha sido aislada de muchos productos marinos, incluídos crustáceos, moluscos y peces, tanto frescos, como congelados o procesados culinariamente y después refrigerados o congelados. La presencia de *L. monocytogenes* en los productos de pescado ahumado se ha detectado en el 25% de las muestras analizadas (37), porcentajes similares se han encontrado en mariscos listos para el consumo.

En langostas, bogavantes y camarones listos para comer se han encontrado cargas bacterianas bajas (desde 0,2 hasta 2 ufc/g) y en los filetes de pescado empanados y congelados, listos para el consumo, también (menos de 100 ufc/g), pero en el pescado ahumado han alcanzado cifras mucho más altas, hasta 10^4 ufc/g (3, 37). Durante la elaboración y almacenamiento de salmón ahumado se comprobó que el recuento de *L. monocytogenes* no variaba durante el marinado y el ahumado, pero durante su almacenamiento a 4-10 ºC alcanzaba cargas microbianas mucho mayores (37).

6.5. Alimentos vegetales

De la mayoría de las hortalizas frescas (rábanos, pepinos, col, patatas, etc.) se han aislado cantidades generalmente bajas de *L. monocytogenes*. A diferencia de las hortalizas de acidez baja (lechuga, escarola, col), que son ingredientes corrientes de ensaladas, los tomates y zanahorias no son un buen sustrato para el crecimiento y multiplicación de *L. monocytogenes* (2, 3, 38, 39). La contaminación de estos alimentos acaece a partir del suelo, el agua, el estiércol animal, la vegetación en descomposición y los efluentes de las aguas residuales de plantas de tratamiento y potabilización del agua.

6.6. Otros productos

Investigando carnes envasadas al vacío se comprobó que el 53% de ellas estaban contaminadas con *L. monocytogenes* (35) y que un 4% contenía más de 1000 ufc/g (una cantidad excesiva para alimentos listos para el consumo). Esto confirmaba, de nuevo, que el crecimiento de este anaerobio facultativo no se afectaba por su envasado a vacío. Otros trabajos con jugo de carne, pollo crudo y pollo empanado precocinado también demostraron que las atmósferas modificadas protegían contra el desarrollo de *L. monocytogenes* (33, 35, 36).

Son muchas las células supervivientes de *L. monocytogenes* que se lesionan o dañan por calentamiento, congelación u otros tratamientos. Las *L. monocytogenes* expuestas al estrés calórico son menos patógenas que las no estresadas, debido a que la energía que normalmente se dedica a la patogénesis se dirige a contrarrestar a los agentes estresantes. En agar no selectivo (o en un alimento) las células dañadas pueden reparar sus lesiones producidas por el estrés y crecen de nuevo. Si estas células se someten a un estrés adicional en agar selectivo o en el alimento, probablemente no se recuperen.

7. AMBIENTE Y LISTERIA MONOCYTOGENES

La *L. monocytogenes* es muy ubicua, como ya se ha dicho. Sobrevive 500 días en tierra húmeda. En heces o en aguas residuales a temperatura ambiental resiste más de un año y a 0-4 ºC, más de 6 (a pH 6 las tasas de multiplicación son más altas que a pH 5). La *L. monocytogenes* se multiplica a pH de 5 a 9, aunque sus valores límites de multiplicación son de 4'4 a 9'5 (véase Tabla 1).

La *L. monocytogenes* se ha encontrado a menudo en mataderos, en las plantas de elaboración y conservación de alimentos, establecimientos de cáterin, etc., incluso cuando se aplican medidas de higiene correctas. La distribución de muchos productos alimenticios es muy extensa, incluso intercontinental. Por ejemplo, en Toledo se confeccionan hamburguesas que se consumen en media Europa y los preparados cárnicos de aves atraviesan a diario muchas fronteras. *L. monocytogenes* sobrevive mucho tiempo en el medio ambiente. Chiarini *et al*. (40) analizaron 851 muestras de diferentes orígenes: alimentos, agua, manipuladores de alimentos y fómites de dos mataderos de aves con igual esquema de trabajo, salvo la evisceración. Hallaron *L. monocytogenes* en el 20,1% de los mataderos que eviscerabaan automáticamente y en el 16,4% de los que lo hacían de forma manual. Los serovares más prevalentes en la planta automática eran el 4b, 4d, y el 4e y en la manual el 1/2a y el 3.

La *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir y crecer en la tierra y en el agua. Estas bacterias han sido detectadas en varios medios acuáticos: agua superficial de canales y lagos, de zanjas y terrenos ganados al mar en Holanda, de efluentes de agua dulce que desaguan en una bahía de California, y en aguas residuales (41). Las plantas de alfalfa y otras cosechas cultivadas en tierra tratada con lodos de aguas residuales están contaminadas con listerias (42). En la mitad de las muestras de rábanos cultivados en tierra inoculada con *Listeria monocytogenes* se encontraron listerias tres meses después de la siembra. También

se ha comprobado la presencia de *Listeria monocytogenes* en pastizales y en ensilados de hierba.

En la mayoría de los países, el 65% de las cepas son de la estirpe II (serotipos 1/2a y 1/2c), que se asocian con brotes esporádicos humanos y el 35% de la estirpe I, serotipos 1/2b, 3b y 4b y de los grupos clonales DUP-ID 1038 y 1042, responsables de varios brotes de listeriosis humana, no se encontraron cepas atípicas ni tampoco de la estirpe III.

8. ECOLOGÍA

Las listerias, como las demás bacterias patógenas, además de afectar directamente a la salud humana y animal, lo hacen también indirectamente, vía sus reservorios, y sus nichos naturales (y los de las granjas, rediles, establos e industrias alimentarias). Las cepas de *L. monocytogenes* que predominan en cada nicho ecológico pertenecen a unos pocos serovares, forman parte de su ecología, modifican su ambiente y reciben de éste, además de nutrientes, múltiples influencias, entre ellas transferencia de genes con sus respectivas funciones.

En el conocimiento de las listerias y su impacto en la salud humana debe tenerse en cuenta que las bacterias son un resultado evolutivo en el que se pueden transmitir propiedades no solo de una estirpe o de un serovar a otro, sino de una especie bacteriana a otra. Así Bigot *et al*. (43) demostraron que el gen o1272 codifica una proteína muy similar a las YlqF de *Bacillus subtilis* y que el gen o1273, puede completar a *Escherichia coli rnhA-rnhB*, cuyo crecimiento termosensible sugiere que codifica a una ARNasa funcional.

Guglieetti *et al*. (44) transfirieron por electroporación y conjugación un gran plásmido obtenido de *Lactococcus lactis* ssp. lactis KYA-7, del intestino de peces a bacterias patógenas del hombre y de otros peces. Ese plásmido alberga el gen tet(S) de resistancia a la tetraciclina y es un potente antagonista de los receptores de *Lactococcus garvieae* y de *Listeria monocytogenes*, impidiendo la conjugación.

Kim y Kathariou (45) encontraron fagos que actúan sobre diversos huéspedes, entre ellos especies de listerias aisladas de las plantas de procesamiento de alimentos; cuando se cultivan en placa a 37 ºC se observa que *L. monocytogenes* es susceptible al fago. Pero si la listeria diana se cultiva a cualquier temperatura inferior a 31 ºC, no se forman placas. Como contraste, las otras cepas testadas del serotipo 4b (incluidos el clon epidémico I y las cepas de otras especies y serotipos de listerias) no se ven influidas por la temperatura a la que crecieron.

La susceptibilidad, dependiente de la temperatura, al fago de las cepas ECII la presentan todas las cepas aisladas de brotes y plantas de tratamiento independendientemente de la presencia o ausencia de plásmidos resistentes al cadmio.

La *L. monocytogenes* del ambiente, especialmente de alimentos, tienen baja patogenicidad y causan infeccionnes discretas o inaparentes que una vez superadas sirven para proteger la listeria contra ulteriores enfrentamientos.

En la leche cruda, los fagos de *S. aureus* transfieren e intercambian los islotes de patogenicidad con *L. monocytogenes*. Los fagos participan en el traspaso y expansión de genes de unas bacterias a otras de diferentes especies. Bacteriófagos, transposones y plásmidos, intervinieron en la adquisición, pérdida, recombinaciones y hasta en las mutaciones de los genes, ocurridas durante la evolución, hasta llegar a las cepas actuales. Por ejemplo Bigot *et al*. (43) encontraron que la proteína codificada por el gen *Listeria monocytogenes o1272*, es muy similar a las proteínas YlqF de *B. subtilis* y que la codificada por el gen *Listeria monocytogenes o1273* es similar a la proteína RnhB de *B. subtilis*.

9. CICLO CELULAR

La infeccion pasa por las siguientes fases:

Cuando las listerias penetran con los alimentos por vía oral son captadas por células fagocíticas, como presentadoras de antígenos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, células todas ellas muy importantes en la inmunidad innata y en la adquirida que constituyen una primera línea defensiva frente a las listerias. Al fagocitarse, forman un fagosoma, que se aproxima a uno o a varios lisosomas con los que contactan y uniéndose sus membranas forman un fagolisosoma, donde sus enzimas y la acidez digieren a muchas bacterias (incluida la membrana celular), enzimas que pueden pasar al medio y destruir desde fuera a células no infectadas. Esta especie de digestión no afecta a las listerias, que son resistentes a los pHs bajos y que están protegidas por su arginina desiminasa, cuya síntesis codifican varios genes de *L. monocytogenes* que se expresan mejor en un pH bajo como el de los fagolisosomas. Las listerias salen del fagosoma por un mecanismo listeriolisínico, crítico para la patogenicidad; las bacterias listeriolisina-deficientes son apatógenas.

Si las células diana son los hematíes, las hemolisinas destruyen su pared, liberándose su hemoglobina, con lo que cambia el aspecto opaco y turbio de la suspensión de glóbulos rojos, del líquido en el que tiene lugar la reacción, y

pasa a rojo transparente. Es la la hemolisis. La actividad de los agentes lisantes se suele determinar por la hemolisis, por ello se les denomina hemolisinas. En agar sangre las colonias de las bacterias que producen estas toxinas originan placas amarillentas.

En las células no fagocíticas (Figura 1) la *L. monocytogenes* se adhiere a ellas primero y luego de forma activa penetra en su interior. Además *L. monocytogenes* tiene una gran capacidad de adhesión a las superficies abióticas, como las usadas en la industria alimentaria y especialmente a las láminas de poliestireno y a las de acero inoxidable. También lo hace a las superficies bióticas como las membranas celulares de enterocitos y hepatocitos sin que influyan el pH, la temperatura, ni las características físico-químicas de la pared bacteriana, adquiridas evolutivamente, ni el flagelo ya que las cepas aflageladas como la *L. monocytogenes* EGD-e tienen la misma adhesividad que las flageladas (14). En la adhesividad debe intervenir algún factor de la pared bacteriana, pues las mutantes rugosas de *L. monocytogenes* no se pueden adherir a los fibroblastos, por lo que no penetran en ellos.

La *L. monocytogenes* se une a receptores superficiales de las células diana, activando vías de señales específicas del huésped, de las que forma parte la IspC, proteína inmunógena, de 86 kDa, cuyos dominios C-terminales son ligandos anclados en la pared, de *L. monocytogenes*, con actividad péptidoglicano hidrolasa, que degrada al péptidoglicano bacteriano, siendo pues una autolisina aunque *in vitro*, no es importante para la división de la listeria ni para su separación, pero sí es esencial para desarrollar toda su virulencia *in vivo* (46).

Las listerias adheridas a la membrana celular inducen a la membrana plasmática, a emitir a su alrededor unas protrusiones, que rodean progresivamente a la listeria formando una bolsa en la que llega a encerrarse rodeada de una vacuola, semejante a un fagosoma con doble membrana (Figura 1).

La actina A o ActA, codificada por el gen *actA* (47), es una proteína de membrana de 610 aminoácidos con una región hidrófoba C-terminal anclada en la membrana de uno de los polos bacterianos que se polimeriza continuamente formando microfilamentos que se unen a uno de los extremos de la listeria, a la que recubren, como una especie de nube de microfilamentos, cuya densidad va disminuyendo hasta ser casi inaparente en el polo opuesto. El acúmulo de clatrina, reordena la actina. La polimerización proporciona energía necesaria para que la *L. monocytogenes* se desplace (57) en el citoplasma celular y posteriormente para que pase a una célula contigua, propagando la infección ya que la *L. monocytogenes* no puede ser atacada por los factores séricos y celulares in-

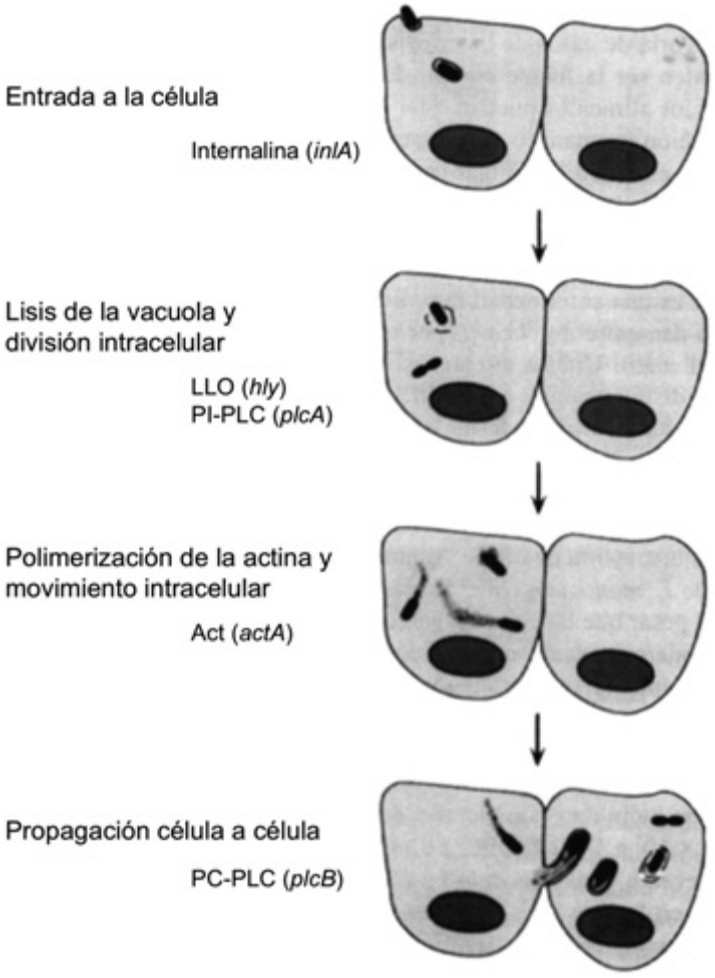


Figura 1. *Representación esquemática de la propagación célula a célula de L. monocytogenes. (Reproducido de Swaminathan, B. p. 383-409. En Doyle, M. P.; Beuchat, L. R. & Montville, R. J. [ed.], Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2nd ed.).*

munitarios. Sorprendentemente, la *E. coli* enteropatógeno, que es extracelular, no utiliza la clatrina para intervenir en la endocitosis sino para formar pedestales ricos en actina.

El genoma de la *L. monocytogenes* dispone de una familia de al menos 11 genes, los inl, que varían según el serovar. Estos genes inl codifican unas pro-

teínas de membrana específicas de especie, llamadas internalinas (Inl). Fueron descubiertas al observar que las cepas virulentas tenían genes que faltaban en las avirulentas. Las Inl, que tienen una parte externa de secuencias repetidas, ricas en leucina (LRR), que va seguida de otra secuencia inmunoglobulínica, de una porción intramembrana, con varios dominios, que es esencial para su función de internar la vacuola y de una parte interna, que conecta con una vía de señales, cuyos efectores abrirán poros en el fagosoma. El fragmento externo se puede desprender, y disolver en el medio extracelular. Las fracciones interna y la transmembranaria más importante, se sintetizan en la fase exponencial del crecimiento. Hay mutantes, que solo expresan la parte soluble de la internalina.

Para que las internalinas actúen se deben unir a receptores, "zippering", específicos de especie. La internalina A, (InlA), de 600 aminoácidos, está codificada por el gen inlA, (48). Es un factor de virulencia, que facilita la entrada de *L. monocytogenes* en las células epiteliales que expresan la isoforma humana de la molécula de adhesión E-caderina, específica de especie a la que se adhiere, induciendo el internamiento de la vacuola en el enterocito, esencial en la infección. Es termodependiente, expresándose más a 37 °C que a 20 °C.

La internalina B, (InlB), tiene 630 aminoácidos con una secuencia de señales y una región de repeticiones ricas en leucina con la misma cadena de aminoácidos que la InlA, pero sin la secuencia de anclaje en la membrana. Actúa uniéndose a su receptor Met, factor de crecimiento del hepatocito; activa la fosforilación.

Una vez que penetra en las células, *L. monocytogenes* escapa de la vacuola pasando al citosol, por la acción de la listeriolisina O (LLO), que se segrega mientras se encuentra en el interior de la vacuola.

La *L. monocytogenes* dispone de numerosos factores de virulencia que le permiten no solo sobrevivir, sino también multiplicarse, tanto en células fagocíticas como no fagocíticas. En este sentido, la listeriolisina 0, principal responsable de la hemólisis y que actúa rompiendo las membranas de los fagolisosomas y de las vacuolas permite, en menos de 30 minutos, la salida al citosol de *L. monocytogenes* donde se multiplica. Es una enzima de 60 kDa, tóxica, con actividad lisogénica, una citolisina que desde el interior de la vacuola abre poros en la doble membrana vacuolar, permitiendo salir a la listeria y pasar de célula a célula.

Las cepas no hemolíticas no producen listeriolisinas por lo que no pasan al citosol. La listeriolisina debe activarse por reducción de tiol-enzimas, entre ellas la tiol-reductasa GILT o Ifi30, del lisosoma inducible por el INF-γ (54). La GILT

es soluble, pesa 30 kDa y pertenece a la familia de las tio-redoxinas. Una vez purificada activa a la listeriolisina, facilitando así la permeabilización de la membrana y la lisis de los hematíes. La listeriolisina se expresa constitutivamente en los lisosomas de las células presentadores de antígenos acumulándose en los macrófagos a medida que se forman los fagolisosomas. El locus activo de la GILT contiene dos moléculas de cisteína. Los ratones que han perdido la GILT son deficientes en la producción de células T CD4(+) del complejo mayor de histocompatibilidad de la clase II y son resistentes a las listerias. *L. monocytogenes* en los macrófagos GILT-negativos y en los mutantes que expresan GILT inactivo salen tarde del fagosoma lo que altera su replicación.

En la lisis de la membrana de las vacuolas o fagosomas también intervienen la lecitinasa y la fosfolipasa C, codificada por el gen *plcB*, situado inmediatamente detrás del *actA* (57). La fosfolipasa C procede de la escisión de su precursora, pre-fosfolipasa C, originada por efecto del gen *plcB*. La fosfolipasa C escinde a la fosfatidilcolina (en cuyo caso se donomina PC-PLC), a la fosfatidilserina y a la fosfatidiletanolamina. También intervienen en la virulencia otras sustancias, incluidas una segunda fosfolipasa, una Zn-metaloproteasa, una proteína de superficie. El gen *mpl* es el primero del operón codificador de una proteasa. La proteasa no ha sido codificada pero los resultados obtenidos con una mutante de *mpl* indican que el producto del gen *plcB* y la proteína *ActA* pueden ser sus sustratos. En cultivos de células monocapa las mutantes de *plcB* producen placas pequeñas. La microscopía electrónica ha puesto de manifiesto que se producen numerosas mutantes en el interior de los fagosomas de doble membrana. Se desconoce si la LLO coadyuva a la lisis de la vacuola de doble membrana. La listeriolisina y las fosfolipasas, PI-PLC y PC-PLC, están codificadas por genes que se agrupan en dos regiones del cromosoma bacteriano (59), es expresan termodependientemente con un máximo a 37 ºC (60).

10. BIOLOGÍA DE LA LISTERIA EN EL CITOSOL

Se creía que el citosol de las células eucarióticas no era propicio para el desarrollo intracelular de bacterias, dado que los patógenos intracelulares para pervivir tienen que inducir la expresión de genes cuyos productos proporcionan un medio adecuado. Los macrófagos infectados con cepas de *Bacillus subtilis* que expresan el gen *hly* permiten que, al menos se desarrolle esta bacteria. En el citosol de la célula huésped (y en la fase exponencial del crecimiento en caldo enriquecido) la *L. monocytogenes* expresa intensamente genes cuyas proteínas,

activan vías de señales específicas del huésped que intervienen en su metabolismo, inducen la síntesis de la pared celular, median la síntesis de proteínas, adaptan el metabolismo bacteriano a los agentes estresantes, especialmente al oxidativo, inducen la síntesis de su pared, modifican sus péptidoglicanos, liberan péptidos neuramínicos y activan a sus genes de virulencia superficiales y a los mecanismos que anulan las defensas del hospedador, incluyendo la resistencia a los péptidos catiónicos.

En el citosol las listerias se dividen cada 60 minutos, de modo que se multiplica rápidamente. En los enterocitos se produce una extensa transcripción que remodela y activa a los genes de virulencia mediados por la SigB (mientras que en los macrófagos son las PrfA las proteínas que controlan a los genes de virulencia). En el citosol, *L. monocytogenes* se multiplica activamente regulada por los promotores listerianos P(actA) y P(hly) (49), habiéndose definido el core y las variables exoproteómicas de *L. monocytogenes*. De las muy diversas proteínas el 65,4% se segregan por la vía de translocación "Sec", relacionando a las bacterias con su medio, y siendo muchos factores de virulencia como los que intervienen en la biogénesis de la pared, según demuestra el análisis exoproteómico.

La *L. monocytogenes*, como otras bacterias, sintetiza isoprenoides, esenciales, para la producción de isopentil difosfato, básico para su desarrollo en medios artificiales, continuando la síntesis por la vía clásica del mevalonato o por la alternativa del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) que requiere los genes gcpE y lytB.

La expresión diferencial del genoma de *L. monocytogenes*, *in vivo* está coordinada por una compleja red reguladora. Al escanear el genoma Crimmins *et al*. (50) identificaron, el transposón Tn917 del gen *L. monocytogenes*o0558 cuyas mutantes alteran los niveles de expresión del IFN-beta; una de ellas induce elevadas cantidades de IFN-beta y alberga un gen codificador de 6-fosfogluconolactonasa (pgl), segunda enzima de la vía del fosfato pentosa, hecho que relaciona por primera vez la vía bacteriana del fosfato pentosa con la activación de la expresión del IFN-beta por el huésped. Una mutante del pgl acumula y segrega grandes cantidades de gluconato, probablemente procedente de la 6-fosfogluconolactona substrato lábil de la Pgl.

La inhibición farmacológica de la PKC-beta reduce significativamente la permeabilización del fagosoma y la llegada de bacterias al citosol. Las cepas virulentas de *L. monocytogenes* como otras procariotas y eucariotas sometidas al estrés térmico, inducen la síntesis de proteínas específicas del estrés térmico (51, 52).

El pirofosfato de tiamina (vitamina B1) es un cofactor esencial que participa en el metabolismo y en la biosíntesis de los aminoácidos derivados de la tiamina. Schauer *et al*. (55), en el caldo mínimo de Welshimer modificado (mMWB), suplementado con tiamina o con su precursor la hidroximetilpirimidina, comprobaron que *L. monocytogenes* puede sintetizar la tiamina solo en presencia del precursor, debido a la pérdida de ThiC, que interviene en la síntesis de aquel. El gen *Lmm0317*, carente de thiD, que probablemente cataliza la fosforilación de la hidroximetilpirimidina, inhibe el crecimiento en el medio de mMWB incluso si se suplementa con hidroximetilpirimidina y se reduce la tasa de replicación de *L. monocytogenes* en las células epiteliales. La mutación del gen *Lmm1429*, transportador de tiamina, reduce la proliferación en el mMWB con tiamina o con fosfatos de tiamina y también en las células epiteliales, pero no interviene en la expresión de los factores de virulencia, Hly y Ac. El análogo tóxico de la tiamina, la piritiamina inhibe el crecimiento de la cepa silvestre EGD.

11. PROPAGACIÓN INTERCELULAR

El ciclo total de la infección celular desde la adhesión de la bacteria a la membrana hasta su salida, dura unos siete días. Las listerias libres (54) se multiplican activamente y pasan a células contiguas por un mecanismo no lítico diseminándose por los órganos diana. Algunas células infectadas son fagocitadas por células con capacidad autofágica, degradándose en el compartimento auto lisosómico. Este es un mecanismo defensivo intrínseco del hospedador contra las bacterias intracelulares como *Streptococcus A*, *Sh. flexneri* y *L. monocytogenes* que evita la autofagia, soslayando el reconocimiento autofágico, sobreviviendo y multiplicándose en el citosol, habiéndose encontrado colas de cometa y la formación de protrusiones sin sufrir la defensa inmunitaria (55). *L. monocytogenes* puede pasar del citosol al compartimento extracelular y de éste a la sangre, que la difunde por los órganos, especialmente hígado, bazo y médula, en los que puede formar focos infecciosos.

12. CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD

Listeria monocytogenes ataca a grupos de riesgo bien definidos: mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos inmunodeprimidos (Tabla 3). En ocasiones también se dan casos en adultos, en los que causa septicemia, meningitis y

meningoencefalitis. Su letalidad es de 20 al 25%. Las situaciones clínicas que predisponen a la listeriosis —como ya hemos señalado— comprenden el cáncer, transplante de órganos, la terapia inmunosupresora, la infección por VIH y la ancianidad avanzada. Las mujeres embarazadas, especialmente en su tercer trimestre, pueden presentar únicamente una sintomatología gripal acompañada de abortos o nacimientos a término muertos (Tabla 4).

Aunque los brotes de listeriosis son muy llamativos, la mayoría de los casos humanos son esporádicos, algunos de ellos son la fuente común y desconocida de ciertos brotes. Si bien en algunos casos pueden estar implicados alimentos, en la mayoría se desconoce el modo de infección. Muchos casos esporádicos no se han asociado con alimentos porque es muy difícil conocer el modo de infección. De otra parte, el tiempo de incubación (5 semanas y más) dificulta el conseguir historiales alimentarios precisos y muestras de los alimentos sospechosos. Se sabe poco de la listeriosis humana y aunque la exposición a *L. monocytogenes* sea bastante común la listeriosis como tal enfermedad es rara. Se

TABLA 3. *Riesgo de listeriosis en diversas poblaciones humanas (Ref. 3).*

Grupo poblacional	**Riesgo relativo**
Población total	1[a]
Mayores de 70 años	3
Embarazadas	17
VIH[b] positivo	200

[a] Riesgo absoluto, 7 casos/millón.
[b] VIH, virus de la inmunodeficiencia humana.

TABLA 4. *Síntomas de la listeriosis sistémica (puede presentarse como).*

- Infección ligera de tipo gripal; no es grave salvo en mujeres embarazadas (abortan).
- Cefalea, somnolencia, coma.
- Infección perinatal.
- Encefalitis.
- Psicosis.
- Mononucleosis infecciosa.
- Septicemia.

desconoce si esto se debe a la resistencia humana o a la baja patogenicidad de la mayoría de las cepas; algunos individuos sanos y asintomáticos eliminan *L. monocytogenes* con las heces. Aunque las listerias tienen como diana las mujeres embarazadas, algunas son portadoras asintomáticas, que llegan a término felizmente dando a luz hijos sanos. Debe hacerse énfasis en que las mujeres infectadas en un embarazo no necesariamente sufren el mismo problema en los siguientes.

En las personas adultas, salvo en las embarazadas, *L. monocytogenes* muestra un tropismo específico por el SNC, con meningitis y meningoencefalitis frecuentes. En ocasiones raras se observan infecciones, precedidas de septicemia, en pacientes listeriósicos sin enfermedades subyacentes, por ejemplo, endocarditis, artritis séptica, osteomielitis, peritonitis, hepatitis, etc. (56). También se han publicado casos de listeriosis gastrointestinal benigna (57).

La listeriosis sistémica o invasora es grave, sobre todo si está afectado el SNC o hay enfermedades subyacentes. Su letalidad es del 20-30% y mayor en individuos inmunodeprimidos, ancianos y embarazadas. La letalidad de los 136 casos declarados en Austria (9) entre los años 1997-2007 fue del 28,7% en los no relacionados con la gestación y del 14% en los ocurridos en mujeres embarazadas. Como se dice en otro lugar, generalmente transcurre bastante tiempo entre la ingestión del alimento que contiene las listerias y la aparición de los síntomas de la enfermedad. *L. monocytogenes* es muy diferente de otros microorganismos transmitidos por los alimentos: es de distribución ubicua, resiste mucho a las condiciones adversas, es psicótrofo y crece en los fagocitos humanos. En los alimentos conserva mucho tiempo su vitalidad, lo mismo que en el suelo, materia en descomposición (vegetales) y en excretas y estiércol. Estas caracaterísticas la convierten en una de las grandes preocupaciones de la industria alimentaria. Todavía no hay acuerdo sobre el modo de tratar con *L. monocytogenes*: si bien la gravedad de la infección que origina y la mortalidad de los casos estudiados requiere un control estricto, sus particularidades biológicas convierten esta opción en poco realista, dado que difícilmente puede asegurarse que todos los alimentos estén libres de esta bacteria.

Además de la listeriosis sistémica antes descrita, hay otra forma gastrointestinal (56), parecida a la toxiinfección salmonelósica. Como ella tiene un periodo de incubación corto (7-18 horas), al principio causa una diarrea discreta que va seguida de gastroenteritis febril. Se conoce como listeriosis gastroentérica o digestiva. Se ha visto (56) que en pacientes ancianos inmunodeprimidos, con el paso del tiempo, a veces da lugar a gastritis purulenta.

13. PATOGENIA Y VIRULENCIA

La patogenicidad de la *L. monocytogenes* para el hombre depende, en gran parte, de la cepa siendo elevada para la mayoría aunque algunas la tienen escasa e incluso se han descrito raras cepas apatógenas, sin que haya relación entre la virulencia con la serovariedad, fagovariedad, ribovariedad (modelo de macrorrestricción del ADN), ni si la cepa procede de enfermos esporádicos o de un brote, o de animales, de alimentos o del ambiente.

La mayoría de las listerias que ingresan con los alimentos resisten a la digestión gástrica, gracias a la fugacidad de su paso y a la actividad de su arginina desiminasa, cuyos genes se expresan mejor en anaerobiosis y en pH bajo. Desde el intestino y por vía hemolinfática accede a órganos, esencialmente al bazo y al hígado, de donde por la bilis puede llegar al intestino.

La patogenicidad se valora determinando la dosis infectante mínima en animales de experimentación y en los enfermos calculando, aproximadamente, el número de *L. monocytogenes* que debió haber ingerido con la cantidad de alimento consumido y las ufc encontradas en el mismo. Los recuentos pueden hacerse en agar triptosa soja con 0,6% de extracto de levadura o en el medio PALCAM. Las técnicas de recuento no son enteramente fiables y el tiempo transcurrido entre el consumo y el análisis del alimento contaminado pudiera aumentar o disminuir su número. La patogenicidad se relaciona indirectamente con las dosis letales, especialmente la DL_{50} que en el ratón es inferior a 10^6, siendo de 10^{8-9} en el caso de las listerias avirulentas o en la membrana corioalantoidea o saco vitelino del embrión de pollo, en la que la DL_{50} de las cepas virulentas es de unos 10^2.

En el hombre y en los animales, la *L. monocytogenes* vehiculada por los alimentos penetra en células no fagocíticas como los enterocitos. Las pruebas de patogenicidad de *L. monocytogenes* se han realizado en cultivos de tejidos y en ratones tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos. Para ello, los ratones se infectan por las vías intraperitoneal, intravenosa o intragástrica y su virulencia se evalúa comparando las dosis letal 50 de los ratones, o bien contando las bacterias del bazo o del hígado. La virulencia de las cepas varía mucho de *L. monocytogenes;* algunas son muy virulentas, otras poco o muy poco y en algunos casos raros no manifiestan virulencia alguna. No se ha observado correlación entre la virulencia y su origen (humano, animal, alimentario o ambiental) ni entre las características de las cepas y la virulencia (9). Si bien se han conseguido y descrito aislamientos raros, apatógenos o débilmente patógenos, se considera que todas las cepas de *L. monocytogenes* son potencialmente patógenas para la especie humana.

14. CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA LISTERIOSIS DE ORIGEN ALIMENTARIO

De las páginas precedentes se deduce que *Listeria monocytogenes* se desenvuelve bien en una gran diversidad de hábitats, entre los que se incluyen el suelo, alimentos ensilados del ganado, aguas y lodos residuales, ambientes en los que se obtienen y elaboran alimentos (plantas lactológicas, queserías, mataderos, industrias charcuteras, etc.) y en las heces de personas y animales sanos. Los porcentajes de vehiculización de listerias, estimadas en personas, varían mucho dependiendo de la fuente contaminante (11). Como se indica más atrás, *L. monocytogenes* infecta a muchas especies animales, además de a la especie humana.

Se ha comprobado que el aborto séptico y la meningitis del ganado ovino y del vacuno puede ocasionarlos el ensilado elaborado incorrectamente en el que se multiplican las listerias.

En ocasiones *L. monocytogenes* ha sido excretada con la leche. En la carne cruda del ganado de abasto, tanto de mamíferos como de aves, se encuentran a veces altos porcentajes de canales contaminadas. En las superficies húmedas de las plantas elaboradoras de alimentos se han encontrado listerias, lo que unido a la capacidad de *L. monocytogenes* de crecer a temperaturas bajas, explica su presencia en frigoríficos industriales y domésticos (véase Tabla 1, los límites de crecimiento de *L. monocytogenes*).

La prevención de la listeriosis humana empieza en las explotaciones ganaderas y en las tierras de cultivo, continúa durante la recolección de las cosechas y sacrificio de los animales en el matadero, sigue durante su acondicionamiento y transporte a las fábricas de productos alimenticios, continúa durante el procesado, almacenamiento, distribución y venta y acaba en la mesa del comedor de los consumidores. Por todo esto, es prácticamente imposible conseguir una dieta normal y variada que esté totalmente exenta de *L. monocytogenes*. Sin embargo, la aplicación de controles higiénicos reduce el riesgo de padecer listeriosis transmitida por los alimentos. Se trata de un caso clásico en el que debe aplicarse el sistema HACCP, desde el campo y la granja hasta el comedor, para reducir al mínimo el reisgo de la listeriosis humana por consumo de alimentos.

14.1. Campos de cultivo

Con frecuencia los suelos agrícolas se hallan contaminados con listerias que proceden del agua de riego estancada y rica en materia orgánica en la que *L. mo-*

nocytogenes se desarrolla bien. Lo mismo puede decirse del estiércol usado como fertilizante, de los restos vegetales en descomposición y de los lodos procedentes de efluentes de aguas residuales de plantas de tratamiento y potabilización de agua.

Solo deben usarse como aguas de riego las de acequias, canalizaciones, hileras y regachos, cuyo curso discurre sin impedimentos y por tanto, sin peligro de estancamiento persistente. Se evitarán todas las procedentes de efluentes urbanos que no hayan sufrido antes un eficaz tratamiento de depuración y no se usarán nunca estiércoles ni lodos que no hayan llegado a la fase de pre-mineralización por un proceso de fermentación conveniente. En otro caso, los productos hortícolas producidos tendrán siempre una considerable carga listeriósica (5, 38, 39).

Listeria monocytogenes se halla a menudo en hortalizas frescas de baja acidez (rábanos, pepinos, col, patatas, etc.), pero en escaso número; por el contrario, en los de acidez alta (tomates y zanahorias) se desarrollan mal (5, 6).

14.2. Explotaciones ganaderas

Cuanto mejor planificados estén los tiempos de limpieza de los animales productores (de leche y/o carne), de eliminación de sus excrementos, de distribución de los piensos —en las explotaciones de tipo intensivo— y de ordeño, tanto mejor será la calidad de la carne y de la leche que produzcan. A este respecto la disponibilidad en los establos de dispensadores automáticos de piensos concentrados y de agua, que permiten la alimentación *ad libitum* del ganado, ha sido un gran avance no solo desde el punto de vista económico (menor necesidad de mano de obra y menor gasto de pienso), sino también desde el higiénico (leche con menos impurezas y cargas bacterianas menores).

Es muy importante controlar la producción de ensilado para lograr su acidificación hasta un pH ≤ 4, única forma de inhibir el desarrollo de grandes recuentos de *L. monocytogenes*. Este control es de gran importancia en el ensilado que consumen los animales productores de leche, ya que ésta, a veces, puede utilizarse, sin pasteurizar, en la elaboración de ciertos tipos de quesos.

Es muy conveniente que la leche se mantenga en las granjas a temperaturas ≤ 4 ºC hasta su transporte a las plantas de elaboración de productos lácteos.

14.3. Transporte

Durante el transporte de los alimentos crudos, salvo que se protejan convenientemente con material impermeable al agua y al polvo, durante la carga y des-

carga de canales, semicanales y cuartos, cabe la posibilidad de contaminación de la carne, vía las manos (incluso con guantes) de los operarios que realizan este trabajo, que transfieren bacterias de las superficies de unas canales a otras.

En el caso de las hortalizas, especialmente las que se utilizan por sus hojas (lechugas, escarolas, acelgas, etc.), las más externas suelen estar contaminadas debido a la tierra y polvo que contienen, de aquí la necesidad de su eliminación para evitar que las bacterias pasen desde estas hojas a las más internas.

Si a todo lo expuesto sumamos que el transporte suele realizarse en vehículos frigorígenos, a temperaturas de 5 ºC, o menores, este ambiente frío frenará el desarrollo de las bacterias mesófilas antagonistas de las listerias, pero no impedirá la multiplicación de *L. monocytogenes*, dada su psicrofilia, en algunos productos vegetales.

14.4. Plantas de procesado

Listeria monocytogenes llega a las plantas de procesado alimentario con el polvo y la tierra que acompañan a los alimentos de origen vegetal, con los deshechos y restos de cajas y otros envases en los que se transportan y con el calzado y los vestidos de los operarios. Los alimentos de origen animal contaminados también pueden actuar de vectores, lo mismo que los portadores humanos y animales sanos. Señalemos a este respecto que *L. monocytogenes* ha sido aislada en muestras fecales de personas sanas (2-6% de las analizadas); en efermos el 21% excretaban 10^4 ufc/g de heces (o más) y el 18% de las personas que convivían con ellos eliminaban también *L. monocytogenes*, de la misma serovariedad e igual perfil isoenzimático (59).

L. monocytogenes se adhiere a diversos tipos de superficies (por ejemplo, acero inoxidable, vidrio y caucho) habiéndose encontrado biopelículas en la carne y en los equipos de las fábricas de alimentos lácteos (60). Las listerias sobreviven en los dedos después de lavadas las manos.

En las plantas lactológicas la fuente principal de *L. monocytogenes* la constituyen los pavimentos, aguas de lavado de suelos y paredes y los vertidos de leche refrigerada. Por ello el control debe centrarse en promover buenos métodos de pasteurización y en la identificación y eliminación de las fuentes contaminantes después del tratamiento pasteurizante (61).

La presencia de *L. monocytogenes* en las canales animales se debe a su contaminación con materias fecales durante el sacrificio. Del 11 al 52% de los ani-

males que llegan a los mataderos para ser sacrificados son portadores sanos. En un matadero de cerdos se vió que el 45% albergaban *L. monocytogenes* en las tonsilas y en uno de vacunos que el 24% la presentaban en los ganglios retrofaríngeos (27, 33).

Tanto en las zonas sucias, como en las limpias de los mataderos se han aislados listerias. Las zonas de trabajo más contaminadas son las de desuello del ganado vacuno y aquéllas en las que se aturden e izan los cerdos.

En los mataderos de aves no se detectaron *L. monocytogenes* en muestras de plumas de pavos y pollos, ni en el agua del sobradero del tanque de escaldado, ni en la piel del cuello, ni en el hígado, corazón y ciego; en cambio si se encontraron en el agua de goteo de la desplumadora, en el sobradero del agua de enfriamiento y en la carne deshuesada mecánicamente. También se aislaron del agua de lavado de las canales recicladas. Estos hallazgos demuestran la importancia de la desplumadora, de los tanques de enfriamiento y del agua reciclada en la contaminación cruzada de las canales de aves (62).

14.5. Almacenamiento

Según se ha señalado en páginas anteriores, *L. monocytogenes* se ha puesto de manifiesto en una gran variedad de alimentos, tanto frescos como procesados. Durante el almacenamiento puede sobrevivir y multiplicarse en muchas materias primas alimenticias. El Servicio del Laboratorio de Salud Pública de Londres puso de manifiesto (63) que el 6% de 18.000 muestras de alimentos estaba contaminado con *L. monocytogenes* y que el 5% de las muestras positivas contenían más de 1.000 ufc/g.

La temperatura de almacenamiento de los alimentos es un factor importante que influye en el riesgo de multiplicación de *L. monocytogenes* en los alimentos perecederos. Su almacenamiento a 5 ºC, e incluso a temperaturas inferiores a ésta, puede retrasar pero no impedir su multiplicación en algunos de estos alimentos.

14.6. Distribución y venta al por menor

Schuchat y colaboradores (64), señalaron en 1991 que los alimentos comprados en la sección de *delicatessen* de los grandes almacenes de productos ali-

menticios podrían estar implicados en casos esporádicos de listeriosis humanas. Aunque no se haya determinado la causa de su implicación deben aplicarse las siguientes normas higiénicas básicas: a) mantener siempre separados los alimentos crudos de origen animal de los alimentos listos para comer; b) utilizar periódicamente y a intervalos convenientes, un método eficaz de limpieza y desinfección del equipo y utillaje empleados para cortar, picar y triturar las materias primas. Ello puede requerir un desmantelamiento previo de la maquinaria (picadoras, mezcladoras, etc.); c) los frigoríficos, armarios expositores, etc., deben disponer de sistemas que indiquen su temperatura y humedad del interior, sin necesidad de abrirlos; d) periódicamente se revisarán las fechas de entrada de los alimentos en los locales de venta y solo se expondrán en los lineales de los autoservicios aquéllos que se encuentren dentro de su vida útil de almacén, esto es, los que estén dentro del periodo en que se garantiza la inocuidad de su consumo con indicaciones como "consumir antes de" o "venta hasta", o similares.

14.7. Consumidores

La población fisiológicamente normal es, en general, resistente a la infección por la cepas de *L. monocytogenes* que se encuentran corrientemente en los alimentos; sin embargo, el riesgo de contraer listeriosis en mucho mayor en las personas cuya inmunidad es débil, por ejemplo, mujeres embarazadas, personas enfermas de SIDA, pacientes oncológicos, ancianos, y otros enfermos con ciertas patologías subyacentes (enfermos con cardiopatías, diabéticos, pacientes con insuficiencia renal, etc.).

Para evitar la listeriosis en las personas citadas deberían seguirse las normas siguientes:

1. No consumir alimentos de origen animal, crudos o poco hechos, esto es, a temperaturas ≤ de 60 ºC.
2. Evitar la contaminación cruzada entre los alimentos crudos y los cocinados y listos para el consumo.
3. Antes de servirlos en el comedor, los alimentos sobrantes de una comida anterior se calentarán hasta que "quemen" al tacto. Si se calientan con hornos de microondas se les concederá tiempo suficiente para que el calor sea el mismo en todas sus partes.

4. No comer patés, quesos blandos frescos (queso mejicano), ni quesos blandos madurados de tipo Camembert, Brie o similares elaborados con leche cruda. Pueden consumirse quesos madurados duros y quesos fundidos (los clásicos quesos en porciones).
5. Las hortalizas se lavarán bien y a fondo antes de ingerirlas.
6. Los frigoríficos de residencias de ancianos, hospitales, etc., se manipularán y prepararán de acuerdo con las más estrictas exigencias de las buenas prácticas de higiene (B.P.H.).
7. Todos los alimentos deben prepararse siguiendo las instrucciones recomendadas por sus fabricantes.
8. Los alimentos perecederos (carne, leche, huevos, pescados y sus derivados) se colocarán en la zona más fría del frigorífico (≤ 4 ºC).
9. Los frigoríficos deben mantenerse en el más perfecto estado de limpieza.
10. No sobrecargar jamás las bandejas y espacios del frigorífico para que se mantenga siempre una temperatura uniforme y el aire circule libremente.

A los lectores que deseen profundizar en el control y prevención de las listeriosis transmitidas por los alimentos, especialmente por los de origen animal les recomendamos la revisión de Farber (65).

15. A MODO DE RESUMEN

En las últimas décadas se ha investigado mucho para profundizar en el conocimiento de esta zoonosis, para definir y delimitar la magnitud del problema de salud pública que representa y su impacto en la industria alimentaria, procurando identificar los factores de riesgo asociados a la infección por *Listeria monocytogenes* y estableciendo las estrategias de control más apropiadas.

Las industrias agroalimentarias han progresado mucho en reducción de la carga de *L. monocytogenes* en los ambientes de las fábricas alimentarias y en los alimentos de mayor riesgo. Se han ideado las medidas preventivas que deben implantarse en las personas con mayor riesgo de infección; según Tappero *et al*. (66) en los EE.UU. se ha reducido mucho la frecuencia de la enfermedad (un 44%) y el porcentaje de enfermos fallecidos (48%).

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Gray, M. L. & Killinger, A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriology Reviews*. **30:** 309-382.
2. Rocourt, J. & Cossart, P. (1997) *Listeria monocytogenes*. En Doyle, M. P., Beuchet, L. R. & Montvile, T. J. (eds.). *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology, Washington, D. C. EE.UU.
3. Montville, T. J. & Matthews, K. R. (2005) *Food Microbiology. An Introduction*, 2nd Ed. ASM Press, Washington, D. C. EE.UU.
4. Murray, E. G. D., Webb, R. A. & Swarm, M. B. R. (1926) A disease of rabbits characterised by a large monoleucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *Journal of Pathological Bacteriology*. **29:** 407-439.
5. Pirie, J. H. H. (1940) *Listeria*: change of name for a genus of bacteria. *Nature*. **154:** 264.
6. Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortulossi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S. & Broome, C. V. (1983) Epidemic listeriosis-Evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine*. **308:** 203-208.
7. Ho, H. L., Shands, K. N., Friedland, G., Eckind, P. & Fraser, D. W. (1986) An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Archives of Internal Medicine*. **146:** 520-524.
8. Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D. W., Yonekura, M. L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L., Kleks, A. & Broome, C. V. (1988) Epidemic listeriosis associated with Mexican-style chesse. *New England Journal of Medicine*. **319:** 823-828.
9. Bille, J. (1990) Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss otubreak. En Miller A. J., Smith, J. L. & Somkuti, G. A. (eds.). *Foodborne Listeriosis*. Amsterdam, Elsevier. Págs. 71-74.
10. Goulet, V., Leoutre, A., Roccourt, J., Cortieu, A. L., Dehaumont, P. & Veit, P. (1993) Epidémie de listériosie en France: Bilan final et résultats de l´enquète épidémiolgique. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*. **4:** 13-14.
11. ICMSF (1996) Microorganisms in Food. 5 Characteristics of Microbial Pathogens. Blackie Academic and Professional, Aspen Publishers, Inc.
12. Buchrieser, C., Brosch, R., Catimel, B. & Rocourt, J. (1993) P*ulsed-field gel electrophoresis* applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Canadian Journal of Microbiology*. **39:** 395-401.

13. Graves, Swaninathan, B., Reeves, M. W., Hunter, S. B., Weaver, R. E., Plikaytis, B. D. & Schuchat, A. (1994) Comparison of ribo*tipar* and multilocus enzyme e1ectrophoresis for sub*tipar* of *Listeria monocytogenes* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **32:** 2936-2943.

14. Tresse, O., Lebret, V., Garmyn, D. & Dussurget, O. (2009) The impact of growth history and flagellation on the adhesion of various *Listeria monocytogenes* strains to polystyrene. *Canadian Journal of Microbiology*. **55:** 189-196.

15. Ammendolia, M. G., Superti, F., Bertuccini, L., Chiarini, F., Conte, M. P., Cipriani, D., Seganti, L. & Longhi, C. (2007) Invasor pathway of *Listeria ivanovii* in human amnion-derived WISH cells. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. **20:** 509-518.

16. Orsi, R. H., Borowsky, M. L., Lauer, P., Young, S. K., Nusbaum, C., Galagan, J. E., Birren, B. W., Ivy, R. A., Sun, Q., Graves, L. M., Swaminathan, B. & Wiedmann, M. (2008) Short-term genoma evolution of *Listeria monocytogenes* in a non-controlled environment. *BMC Genomics*. **9:** 539.

17. Vasconcelos, R. M., Almeida, A. E., Hofer, E., Silva, N. M. & Marin, V. A. (2008) Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. *Memories of the Instute Oswaldo Cruz*. **103:** 836-838.

18. Borlin, J. C. & Piffaretti, J. C. (1991) *Tipar* of human, animal, food and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology*. **57:** 1624-1629.

19. Garrido, V., Torroba, L., García-Jalón, I. & Vitas, A. I. (2008) Surveillance of listeriosis in Navarre, Spain, 1995-2005—epidemiological patterns and characterisation of clinical and food isolates. *Euro Surveillance*. 13. pii: 19058.

20. Bania, J., Zarczynska, A., Molenda, J., Dabrowska, A., Kosek-Paszkowska, K., Wieckowska-Szakiel, M. & Rózalska, B. (2009) Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates by actA gene sequencing, PCR-fingerprinting, and cell-invasion assay. *Folia Microbiologica* (Praga). **54:** 17-24.

21. Gianfranceschi, M. V., D'Ottavio, M. C., Gattuso, A., Bella, A. & Aureli, P. (2009) Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002-2005). *Food Microbiology*. **26:** 520-526.

22. Liu, D., Lawrence, M. L., Austin, F. W. & Ainsworth, A. J. (2007) A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*. 71: 133-140.

23. Levraud, J. P., Disson, O., Kissa, K., Bonne, I., Cossart, P., Herbomel, P. & Lecuit, M. (2009) Real-time observation of *Listeria*-phagocyte interactions in the living zebrafish larva. *Infectious Immunology*. **77:** 1458-1465.

24. Shetty, A., McLauchlin, J., Grant, K., O'Brien, D., Howard, T. & Davies, E. M. (2009) Outbreak of *Listeria monocytogenes* in an oncology unit associated with sandwiches consumed in hospital. *Journal of Hospital Infectious*. **4:** 580-589.

25. Esteban, J. I, Oporto, B., Aduriz, G., Juste, R. A. & Hurtado, A. (2009) Faecal shedding and cepa diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC. Vet. Res*. **5:** 2.

26. Hardy, J., Chu, P. & Contag, C. H. (2009) Foci of *Listeria monocytogenes* persist in the bone marrow. *Dis. Model Mech*. **2:** 39-46.

27. Skovgaard, N. & Norrung, B. (2009) The incidence of *Listeria sp*. in faeces of Danish pigs and in minced pork meat. *International Journal of Food Microbiology*. **8:** 59-63.

28. Mascola, L., Sorvillo, F., Goulet, V., Hall, B., Weaver, R. & Linnan, M. (1992) Fecal carriage of *Listeria monoocytogenes*-observations during a community wide, common-source outbreak. *Child Infections Diseases*. **15:** 557-558.

29. Husu, J. R., Seppänen, T. J., Sivelä, S. K. & Rauramaa, A. L. (1990) Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on dairy farms. *Journal of Veterinary Medicine, B*. **37:** 309-314.

30. Schuchat, A., Deaver, K. A., Wenger, J. D., Plikaytis, B. D., Mascola, L., Pinner, R. W., Reingold, A. L. & Broome, C. V. (1992) Role of foods in sporadic listeriosis. Case-control study of dietary risk factors. *Journal of American Medical Association*. **267:** 2041-2045.

31. Meloni, D., Galluzzo, P., Mureddu, A., Piras, F., Griffiths, M. & Mazzette, R. (2009) *Listeria monocytogenes* in RTE foods marketed in Italy: prevalence and automated EcoRI ribo*tipar* of the isolates. *International Journal of Food Microbiology*. **129:** 166-173.

32. Lovett, J. D., Francis, W. & Hunt, J. M. (1987) *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *Journal of Food Protection*. **50:** 188-192.

33. Buncié, S. (1991) The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. *International Journal of Food Microbiology*. **12:** 173-180.

34. Genigeorgis, C. M., Carnicu, M., Dutulescu, D. & Farver, T. B. (1991) Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30 ºC. *Journal of Food Protection*. **54:** 662-668.

35. Grau, F. H. & Vanderlinde, P. B. (1992) Occurrence, numbers and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *Journal of Food Protection.* **55:** 4-7.

36. Johanson, J. L., Doyle, M. P. & Cassens, R. G. (1990) *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in meat and meat products-a review. *Journal of Food Protection*. **51:** 81-91.

37. Guyer, S. & Jemmi, T. (1991) Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked *Listeria monocytogenes*. *Applied Environmental Microbiology*. **57:** 1523-1527.

38. Beuchat, L. R. & Brackett, R. E. (1990) Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. **56:** 1734-1742.

39. Zhang, G., Ma, L., Beuchat, L. R., Erickson, M. C., Phelan, V. H. & Doyle, M. P. (2009) Evaluation of treatments for elimination of foodborne pathogens on the surface of leaves and roots of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Protection*. **72:** 228-234.

40. Chiarini, E., Tyler, K., Farber, J. M., Pagotto, F. & Destro, M. T. (2009) *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: Manual and automatic evisceration. *Poultry Science*. **88:** 791-797.

41. Colburn, K. G., Kaser, C. A., Abeyta, C. Jr. & Weksil, M. (1990) *Listeria* species in a California estuarine environment. *Applied Environmental Microbiology*. **56:** 2007-2011.

42. Al-Ghazali, M. R. & AI-Azawi, S. K. (1990) *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage sludge cake. *Journal of Applied Bacteriology*. **69:** 642-674.

43. Bigot, A., Raynaud, C., Dubail, I., Dupuis, M., Hossain, H., Hain, T., Chakraborty, T. & Charbit, A. (2009) *Listeria monocytogenes* o1273, a novel gene involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Microbiology*. **155:** 891-902.

44. Guglieetti, E., Korhonen, J. M., Heikkinen, J., Morelli, L. & von Wright, A. (2009) Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments. *FEMS Microbiology Letters*. **293:** 28-34.

45. Kim, J. W. & Kathariou, S. (2009) Temperature-dependent phage resistance of *Listeria monocytogenes* epidemic clone II. *Applied and Environmental Microbiology*. **75:** 2433-2438.

46. Wang, L. & Lin, M. (2008) A novel cell wall-anchored peptidoglycan hydrolase (autolysin), IspC, essential for *L. monocytogenes* virulence: genetic and proteomic analysis. *Microbiology*. **154(Pt 7):** 1900-1913.

47. Kocks, C., Couin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. & Cossart, P. (1994) *Listeria monocytogenes* induced actin assembly requires the ActA gene product, a surface protein. *Cell*. **68:** 521-531.

48. Gaillard, J., Buche, L. P., Frehel, C., Gouin, E. & Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by inteARNlin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. *Cell*. **65:** 1127-1141.

49. Dumas, E., Desvaux, M., Chambon, C. & Hébraud, M. (2009) Insight into the core and variant exoproteomes of *Listeria monocytogenes* species by comparative subproteomic análisis. *Proteomics*. **9:** 3136-3155.

50. Crimmins, G. T., Schelle, M. W., Herskovits, A. A., Ni, P. P., Kline, B. C., Meyer-Morse, N., Lavarone, A. T. & Portnoy, D. A. (2009) *Listeria monocytogenes* 6-Phosphogluconolactonase mutants induce increased activation of a host cytosolic surveillance pathway. *Infectious Immunology*. **77:** 3014-3022.

51. Sokolovic, Z. & Goebel, W. (1989) Synthesis of bacteriolysin in *Listeria monocytogenes* under heat shock conditions. *Infectious Immunology*. **57:** 295-329.

52. Sokolovic, Z., Fuchs, A. & Goebel, W. (1990) Synthesis of species specific stress proteins by virulent cepas of *Listeria monocytogenes*. *Infectious Immunology.* **58:** 3582-3587.

53. Schauer, K., Stolz, J., Scherer, S. & Fuchs, T. M. (2009) Both thiamine uptake and biosynthesis of thiamine precursors are required for intracellular replication of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*. **191:** 2218-2227.

54. Singh, R., Jamieson, A. & Cresswell, P. (2008) GILT is a critical host factor for *Listeria monocytogenes* infecttion. *Nature*. **455:** 1244-1247.

55. Portnoy, D., Chakraborty, A. T., Goebel, W. & Cossart, P. (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infectious Immunology*. **60:** 1263-1267.

56. Nieman, R. E. & Lorber, B. (1980) Listeriosis in adult: a changing pattern-report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. *Reviews of Infectious Diseases*. **2:** 207-227.

57. Cossart, P. (1995) Actin-based bacterial motility. *Current Topics of Cell Biology*. **7:** 94-101.

58. Riedo, F. X., Pinner, R. W., Tosca, M. D., Carter, M. L., Graves, L. M., Reeves, M. W., Weaver, R. C., Plykatis, B. D. & Broome, C. V. (1994) A point-source of foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illnes. *Journal of Infectious Diseases*. **170:** 693-696.

59. Schuchat, A., Deaver, K., Hayes, P. S., Graves, L., Mascola, L. & Wenger, J. D. (1993) Gastrointestinal carriage of *Listeria monocytogenes* in household contacts of patients with listeriosis. *Journal of Infectious Diseases*. **167:** 1261-1262.

60. Jeong, D. K. & Frank, J. F. (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* at 10 ºC in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing enviroments. *Journal of Food Protection*. **57:** 576-586.

61. Walker, R. L., Jensen, L. H., Kinde, H., Alexander, A. V. & Owen, L. S. (1991) Enviroment survey for *Listeria* species in frozen milk plants in California. *Journal of Food Protection*. **54:** 178-182.

62. Genigeorgis, C. A., Dutulescu, D. & Fernández Garayzabal, J. (1989) Prevalence of *Listeria spp*. in poultry meal at the supermarket and slaughterhouse level. *Journal of Food Protection*. **52:** 618-624.

63. McLauchlin, J. & Gilbert, R. J. (1990) *Listeria* in food. *PHLS Microbiology Digest*. **7:** 54-55.

64. Schuchat, A., Swaminathan, B. & Broome, C. V. (1991) Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*. **4:** 169-183.

65. Farber, J. (1992) Prevention and control of foodborne listeriosis. *Dairy, Food and Environmental Sanitarian*. **12:** 334-340.

66. Tappero, J. W., Schuchat, A., Deaver, K. A., Mascola, L. & Wenger, J. D. (1995) Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts. *Journal of the American Medical Association.* **273:** 1118-1122.

8. Cryptosporidium y Toxoplasma. Dos importantes protozoos parásitos transmisibles por los alimentos y el agua

BERNABÉ SANZ PÉREZ
Académico Numerario de la Real Academia Nacional de Farmacia.

PARTE I. CRIPTOSPORIDIOSIS

I.1. INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad zoonósica que afecta tanto a la especie humana, como a los animales de renta, incluídas las aves y una gran variedad de animales silvestres. Supone además una gran carga económica para las empresas que gestionan el abastecimiento de agua a los grandes municipios. En los últimos años las investigaciones sobre esta enfermedad y su agente causal, el género *Cryptosporidium*, han sido muchas y variadas, sin embargo, las revisiones publicadas han prestado especial atención a dos aspectos:

1) a la taxonomía, descripción, biología y nomenclatura de sus especies, y
2) a su transmisión por el agua de abastecimiento contaminada de los grandes depósitos municipales.

Esto se ha debido a dos hechos fundamentales, a saber, 1) al desarrollo y disponibilidad de técnicas, aparatos y utillaje que han posibilitado profundizar en la epidemiología molecular, y 2) al soporte financiero de las grandes empresas gestoras del abastecimiento de agua a las grandes urbes. Los últimos avances en cultivos *in vitro*, un mayor conocimiento del ciclo biológico y la secuenciación completa del genoma de *Cryptosporidium parvum* (63) han permitido entender y reinterpretar muchos aspectos de su biología

y ecología, pero todavía quedan por aclarar varias lagunas que precisan de más investigaciones.

I.2. HISTORIA

Tyzzer fue el primero en describir, a principios del siglo XX, una infección en el ratón común (*Mus musculus*), debida a un protozoo del género *Cryptosporidium* (1). En 1955 Slavin señaló a este protozoo como causa posible de diarreas en pavos (2). Más tarde, en el decenio de 1970, se comprobó su presencia en los terneros (3). Sin embargo, hasta que no se describieron una serie de diarreas en pacientes humanos de SIDA —de los que algunos murieron— y se comprobó que el agente causal era un criptosporidio, no se prestó demasiada atención al agente etiológico (4).

Las criptosporidiosis atrajeron pronto la atención de la población de EE.UU. a causa del brote que se produjo en Milwaukee (Wisconsin) en 1993, debido al consumo de agua contaminada del abastecimiento público (5). Se tardaría poco tiempo en demostrar que era uno de los problemas más graves y difíciles de controlar al que se enfrentaban las autoridades que gestionaban el abastecimiento de agua a las ciudades. Algunas publicaciones ulteriores (6, 7) dieron cuenta de la difusión por todo el mundo y de la importancia zoonósica del género *Cryptosporidium* (véase Tabla I.1).

I.3. CRIPTOSPORIDIOSIS Y SU TRANSMISIÓN

La criptosporidiosis cursa como una enfermedad diarréica, de gravedad variable, que en los individuos con buen estatus inmune desaparece pronto, mientras persiste en los inmunodeprimidos, causándoles gran debilidad y terminando, a veces, con el éxito letal. *Cryptosporidium* es, por tanto, un patógeno severo para los pacientes de SIDA. Su diagnóstico apenas preocupa fuera del círculo de los enfermos inmunodeficientes, de aquí que sean pocos los laboratorios que analizan, de forma rutinaria las heces en busca de criptosporidios, salvo que se solicite específicamente. Además, en caso de diagnóstico laboratorial positivo son pocas las notificaciones oficiales que llegan a los centros nacionales de vigilancia epidemiológica (8).

Un solo ooquiste es suficiente para causar la enfermedad en los hospedadores susceptibles (9). Los ooquistes se transmiten corrientemente siguiendo la

Tabla I.1. *Brotes de criptosporidiosis, agentes transmisores y especies responsables.*

Año	Ciudad o Estado	Transmitido por	Especie responsable
1993	Milwaukee, Wis. EE.UU.	Agua	*C. hominis*
1993	Maine, EE.UU.	Alimentos	*C. parvum*
1996	British Columbia, Canadá.	Agua	*C. parvum (Cranbrook); C. hominis (Kelowna)*
1997	Pennsylvania, EE.UU.	Contacto con animales	*C. parvum*
1998	Washington, EE.UU.	Alimentos	*C. hominis*
2000	Irlanda del Norte, RU.	Agua x 2	*C. parvum y C. hominis*
2002	Queensland, Australia.	Alimentos	*C. parvum*
2003	Francia.	Agua	*C. hominis*

De Thompson (14, 15) y Xiao et al. (16) (con ligeras modificaciones).

ruta fecal-oral, por contacto directo de hospedador-hospedador y vía los alimentos o el agua contaminados; por último también se ha comprobado la transmisión por inhalación, vía aerosoles o gotitas de exudaciones al toser y estornudar (10). El carácter zoonósico de los criptosporidios lo han confirmado una serie de estudios epidemiológicos con animales de renta, de compañía y silvestres y algunas infecciones contraídas accidentalmente por veterinarios, estudiantes y auxiliares de clínicas veterinarias (11). Los alimentos manipulados por operarios infectados o enfermos de criptosporidiosis y los expuestos al agua contaminada han servido de fuentes de criptosporidios para otros alimentos (12, 13). Los vegetales cosechados en suelos abonados con estiércol también son una fuente potencial de infección, sin embargo, para la especie humana el agua contaminada es la fuente de contagio más importante. Los ooquistes de *Cryptosporidium* permanecen viables en el agua 140 días y son muy resistentes a la mayoría de desinfectantes corrientes (17) lo que dificulta mucho e incluso impide su destrucción por la cloración normal de las aguas. Algunos brotes de criptosporidiosis se han debido a la contaminación con ooquistes de las aguas superficiales, otros a las de pozos y piscinas y los brotes con mayor número de afectados, a la contaminación del agua de los depósitos de suministro a las ciudades (18, 19). En EE.UU. el 80-90% de las aguas superficiales (ríos, lagos, lagunas, estanques, etc.) contienen ooquistes (20). Algunos estudios de dicho país indican que el 97% de las aguas superficiales que abastecen las plantas de tratamiento y el 54% de las filtradas y cloradas contienen una pequeña cantidad de

ooquistes de *Cryptosporidium* (21). De otra parte, las aguas de recreo, como las piscinas, *jacuzzi*, estanques y fuentes pueden estar contaminadas con vertidos de heces animales y humanas (22).

Aunque los brotes de criptosporidiosis por aguas contaminadas se atribuyen a fuentes pecuarias y especialmente al ganado vacuno, por la prevalencia de diarreas criptosporidiósicas en los terneros, su implicación rara vez se ha confirmado al investigar los brotes (22). El riesgo potencial de las criptosporidiosis de los animales silvestres, e igualmente de los de compañía, tampoco se ha evaluado suficientemente, en muchos casos, a pesar de constituir un problema serio. Se han detectado perros y gatos enfermos, portadores de *Cryptosporidium* (23, 24). En la Tabla I.2 se señalan no solo las especies de criptosporidios identificadas hasta ahora, sino también los animales de compañía, de renta y silvestres que, además de la especie humana, sirven de fuente de contaminación y de reservorios ambientales para las personas y animales (25, 26).

I.4. PRINCIPALES CARACTERÍSITICAS BIOLÓGICAS

Recordemos que el género *Cryptosporidium* es un miembro del *phyllum Apicomplexa*, clase *Sporozoosida*, subclase *Coccidiasina*, orden *Eucooccidiida*, suborden *Eimerina* y familia *Cryptosporidiidae*.

Basándose en sus hospedadores, morfología, hospedador preferido y tejido preferente de asentamiento, se han descrito 22 especies distintas de *Cryptosporidium*. Sin embargo, su número ha ido disminuyendo a medida que se profundizaba en su conocimiento y hoy son solo las 13 que se incluyen en la Tabla I.2.

En un principio *Cryptosporidium* se clasificó como coccidio, basándose en la semejanza de los ciclos biológicos de ambos géneros (40), pero tiene una serie de características que lo diferencian de los coccidios:

1. Su situación en la célula hospedadora (Figura I.1), donde el desarrollo de las formas endógenas se limita a las superficies apicales de las células epiteliales, esto es, en el interior celular pero fuera del citoplasma. La fijación del parásito a la célula tiene lugar por una organela multimembranosa, u organela nutricia, que se forma en la base de la vacuola parasitófora para facilitar el aporte de nutrientes desde la célula hospedadora.
2. La presencia de dos tipos de ooquistes morfofuncionales, uno de pared gruesa y otro de pared fina (o delgada); éste con la misión de iniciar el ciclo autoinfectante en el hospedador parasitado.

Tabla I.2. *Especies de Cryptosporidium, hospedadores, autores, año de publicación y cita bibliográfica.*

Especie	Hospedadores		Autores y Año	Citas
	Nombre científico	Nombre vulgar		
*C. parvum**	*Mus musculus*	Ratón común	Tyzzer, 1912	(27)
	Bos taurus	Vacuno	Panciera *et al.,* 1971	(3)
	Homo sapiens	Hombre	Nime *et al.,* 1976	(28)
	Sus scrofa	Cerdo	Kennedy *et al.,* 1977	(29)
	Ovis aries	Oveja	Barker *et al.,* 1974	(30)
	Capra hircus	Cabra	Tziperi *et al.,* 1982	(31)
	Equus caballus	Caballo	Snyder *et al.,* 1978	(32)
C. hominis	*Homo sapiens*	Hombre	Morgan-Ryan, *et al.* 2002	(33)
C. muris	*Mus musculus*	Ratón común	Tyzzer, 1910	(34)
	Homo sapiens	Hombre	Katsumata *et al.,* 2000	(35)
C. nasorum	*Naso litoratus*	Naso1	Hoover *et al.,* 1981	(36)
C. molnari	*Sparus aurata*	Dorada	Álvarez-Pellitero *et al.,* 2002	(37)
C. meleagridis	*Meleagridis gallopavo*	Pavo	Slavin, 1955	(2)
	Homo sapiens	Hombre	Morgan *et al.,* 2000	(38)
C. bailey	*Gallus gallus*	Gallina	Current *et al.,* 1986	(39)
C. serpentis	*Elaphe gutlata*	Serpiente cornuda[2]	Levine, 1980	(40)
	E. subocularis	Serpiente rata	Xiao *et al.,* 2004	(41)
		Varias especies de lagartos		
	Sanzinia madagascarensis	Boa de Madagascar		
C. wairi	*Cavia porcellus*	Cobaya	Vetterling *et al.,* 1971	(42)
C. felis	*Felix catis*	Gato	Iseki, 1979	(43)
	Homo sapiens	Hombre	Pieniazek *et al.,* 1999	(44)
C. cania	*Canis familiaris*	Perro	Wilson *et al.,* 1983	(45)
	Homo sapiens	*Hombre*	Morgan *et al.,* 2000	(46)

Especie	Hospedadores		Autores y Año	Citas
	Nombre científico	Nombre vulgar		
C. andersoni	*Bos taurus*	Vacunos	Lindsay, 2000	(47)
C. saurophilum	*Eumeces schneideri*[3]	Lagartos	Koudela *et al.,* 1998	(48)
		Varias especies de serpientes	Xiao *et al.,* 2004	(41)
		Varias especies de lagartos	Xiao *et al.,* 2004	(41)

* Sólo los hospedadores más citados; [1] Pez de arrecifes coralinos; [2] Colúbrido de grandes manchas irregulares; [3] Un lagarto tropical.

3. El pequeño tamaño del ooquiste que carece, además, de estructuras morfológicas, como esporocito, micropilo y gránulos polares (49).
4. La gran resistencia de *Cryptosporidium* a casi todos los biocidas anticoccidiósicos ensayados hasta ahora (17, 50).

Thompson *et al.* (51) señalan en su revisión que las afinidades fitogenéticas de los criptosporidios son muy llamativas, pero deben valorarse de acuerdo con los nuevos datos disponibles sobre desarrollo, genómica y biología molecular. Pienso que un estudio a fondo sobre estos aspectos sería salirnos del objetivo de este libro y además, una temeridad por mi parte. A quienes deseen profundizar en su taxonomía, desarrollo, necesidades nutritivas, metabolismo, etc., les recomiendo las revisiones de Zhu (52), Zhu y Abrahamsen (53), Zhu *et al*. (54), Ramírez *et al*. (55) y Thompson *et al*. (51).

Se ha demostrado con ensayos *in vivo* e *in vitro* que las distintas formas de desarrollo del parásito penetran en las células intestinales del hospedador y se unen a sus superficies apicales. Sin embargo, todavía es mucho lo que se desconoce sobre mecanismos usados para invadir las células hospedadoras del epitelio intestinal y situarse en ellas. Al principio se desplaza con movimientos deslizantes suaves (que son actina-dependientes) y siguiendo probablemente un camino marcado por el propio parásito, penetra en la superficie apical de las células intestinales (borde en cepillo), donde descansa en un lecho de proteínas del hospedador, ligadas a la actina (56).

El desarrollo endógeno del parásito implica una secuencia de eventos: formación de la vacuola parasitófora, desarrollo de la organela nutricia y multiplia-

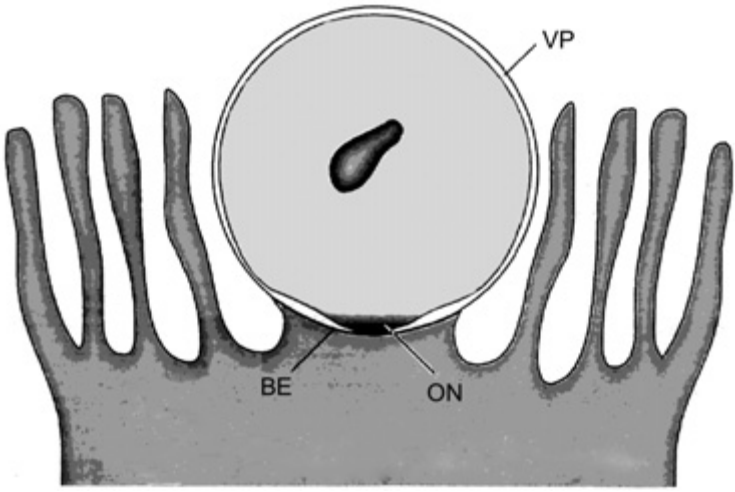


Figura I.1. *Localización del criptosporidio en la célula hospedadora (VP = Vacuola Parasitófora; BE = Banda Electrónica Densa; ON = Organela Nutricia). Representación esquemática. Referencia (51).*

ción asexual y sexual. Todos estos acontecimientos han sido revisados, entre otros, por Upton (57), Arrowood (58), Hijjawi (59) y Huang *et al.* (60). Por otra parte, Morrissete y Sibbley (61) han estudiado el nicho vacuolar extracitoplásmico que permanece en la zona de los *villi* de la superficie apical, pero separado del citoplasma, como hemos dicho antes, lo que determina la aparición de un abultamiento que sobresale en el lumen intestinal (Figura I.1).

I.4.1. Ciclo biológico

Los recientes descubrimientos de nuevas formas de desarrollo extracelulares, junto con la capacidad de *Cryptosporidium* de completar todo su ciclo biológico sin necesidad de células hospedadoras (62) demuestran que *no es un parásito intracelular obligado*.

Dado que *Cryptosporidium* no necesita invadir célula hospedadora alguna para completar su ciclo, podríamos preguntarnos con Thompson *et al*. (51) ¿por qué el parásito se comporta como tal *in vivo*? y ¿cuál es la cuantía de población criptosporidiósica extracelular *in vivo*? Su número varía dependiendo del *status* inmunológico y de otros factores del hospedador.

Su nicho intracelular, pero extracitoplásmico, le permite al parásito evadirse del control inmune y aprovecharse del transporte de solutos a través de la membrana de los *villi* de la célula hospedadora y de la vacuola parasitófora (63).

El ciclo biológico de *Cryptosporidium* es complicado e implica fases de desarrollo sexual y asexual (Figuras I.2 y I.3). El ooquiste esporulado es la única forma exógena conocida, consiste en 4 esporozoitos dentro de una pared ooquística resistente a las condiciones ambientales. Una vez ingerido o inhalado se exquista en el tracto intestinal o en el respiratorio, liberando los esporozoitos que rápidamente invaden las células epiteliales del intestino delgado (principalmente del íleon) o del árbol respiratorio, comenzando la fase endógena del ciclo.

En el interior de las células hospedadoras los esporozoitos se transforman en unas formas esféricas, conocidas como trofozoitos; pronto experimentan una

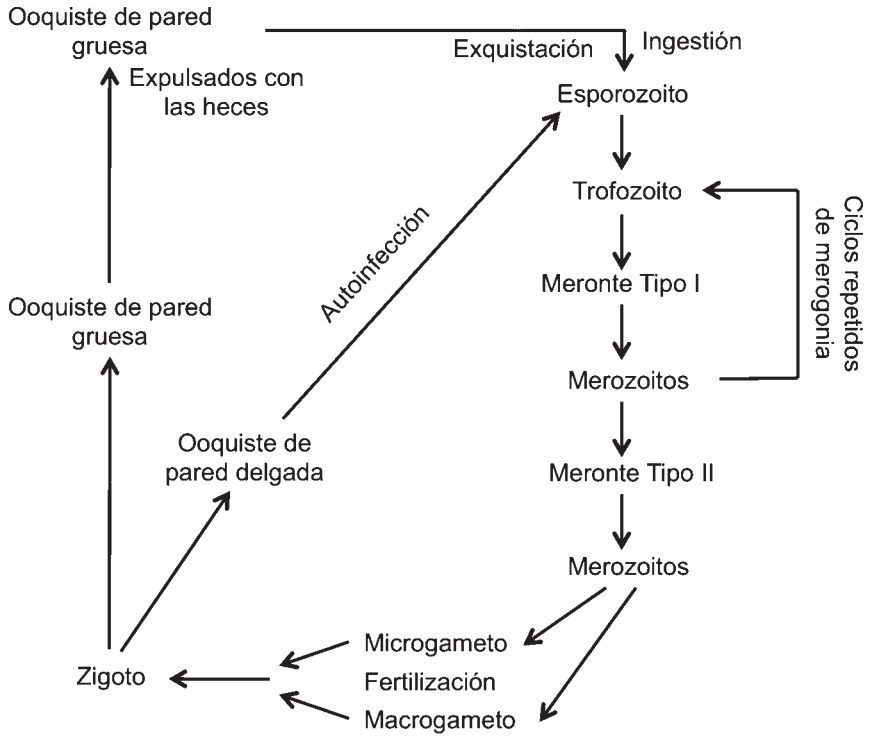


Figura I.2. *Representación diagramática del ciclo biológico de C. parvum en el epitelio de la mucosa intestinal de un mamífero parasitado; basada en los conocimientos previos al año 2000. En el texto se dan detalles más recientes. Referencia (51).*

proliferación asexual por mesogonia (llamada antes esquizogonia), formando merontes que contienen merozoitos de dos tipos: los de tipo I (8 merozoitos por meronte) al madurar se liberan de las vacuolas parasitóforas. Se admite que en condiciones ambientales favorables se reciclan indefinidamente. Algunos merozoitos de tipo I penetran en las células hospedadoras donde forman merontes de tipo II que contienen, cada uno, 4 merozoitos.

Los merozoitos de tipo II, una vez liberados, penetran en células hospedadoras adyacentes comenzando la fase sexual del ciclo biológico. Dentro de estas células los merozoitos de tipo II crecen y forman macrogametos (macrogametocitos) o bien, dividiéndose por fisión, originan microgametocitos, de los que 14-16 carecen de flagelos. Los microgametos penetran en las células y fusionándose con los macrogametos forman un zigoto que se rodea de una pared

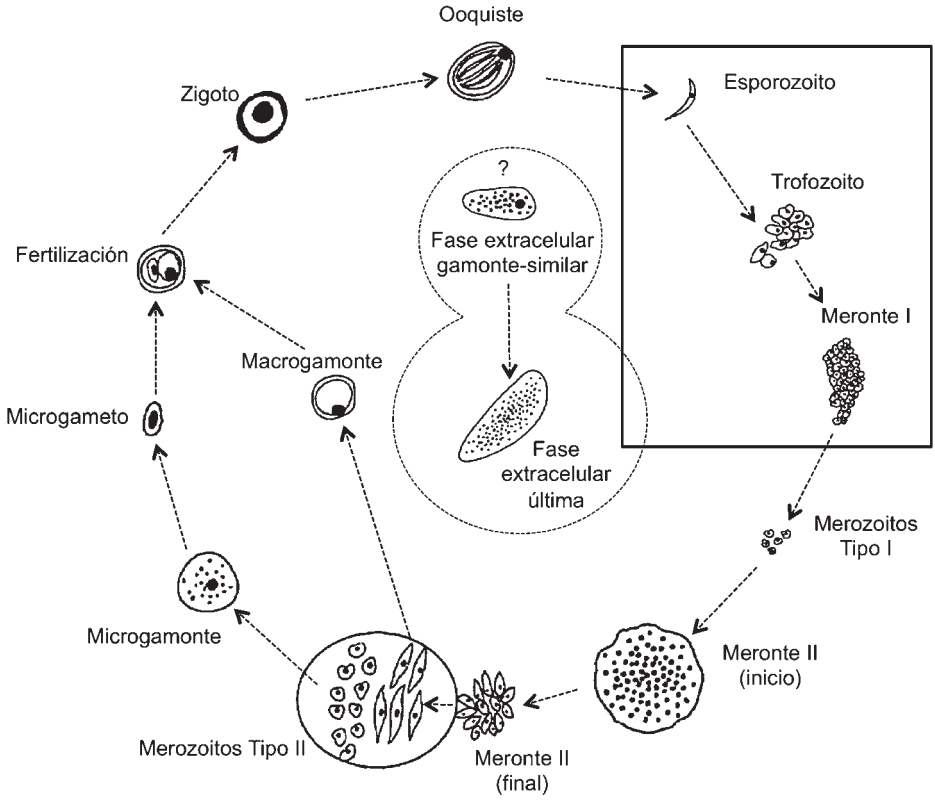


Figura I.3. *Ciclo biológico de Cryptosporidium en cultivo libre de células hospedadoras. Referencias (40, 59).*

o membrana de ooquiste resistente en donde, por esporogonia, se originan esporozoitos.

El 80% aproximadamente de los ooquistes formados al terminar el ciclo son ooquistes de pared gruesa; el hospedador los expulsa con las heces si se localizan en el tracto gastroentérico, o vía aerosoles y por la secreción nasal, si se ubican en el respiratorio. Sin embargo, un 20%, aproximadamente, de los ooquistes no desarrollan pared gruesa por lo que se denominan ooquistes de pared delgada. Son los responsables de autoinfecciones debidas al reciclado continuo de esporozoitos por exquistación de los ooquistes de pared delgada. Por lo expuesto, el género *Cryptosporidium* tiene dos ciclos autoinfectantes mediados por los merozoitos de tipo I y por los ooquistes de pared delgada.

Thompson *et al*. (51) analizan con detalle los trabajos publicados sobre las diferentes formas de desarrollo de *Cryptosporidium* tanto *in vitro* (cultivos celulares y cultivos libres de células), como *in vivo* en modelos animales. Su lectura es muy de recomendar, al igual que las publicaciones de Arrowood (58) y Hijjawi (39, 62) ya citadas.

I.5. RELACIONES PARÁSITO HOSPEDADOR

I.5.1. Patogénesis

Los cambios producidos por efecto de la criptosporidiosis en los hospedadores humanos y animales (diarrea, pérdida de peso y otros) al principio no se entendieron suficientemente bien, pero investigaciones recientes con modelos animales han aclarado mucho la fisiopatología de la enfermedad y la comprensión de los signos clínicos. El complicado ciclo biológico del parásito, la variedad de formas que albergan los hospedadores, las diversas especies de *Cryptosporidium* existentes y su predilección por los diferentes tejidos de las distintas especies hospedadoras contribuyen a dificultar la comprensión de las interacciones parásito-hospedador. En la Tabla I.3 se muestra la especificidad tisular de algunas especies de *Cryptosporidium*.

En infecciones experimentales con *C. parvum* los signos clínicos aparecen entre los 2-7 días después de contagiados los animales, y dependiendo de su estado inmunitario el periodo prepatente (es decir, el tiempo transcurrido entre la infección y la dispersión de ooquistes) varía de algunos días a varios meses y hasta años (64).

Las células intestinales se infectan con los esporozoitos que emergen de los ooquistes de pared gruesa, que se ingieren con los alimentos y también con los que producen los ooquistes de pared delgada, que se originan en los enterocitos infectados, en los que ha tenido lugar la reproducción sexual y asexual. Otras formas extracelulares que se desarrollan en el lumen intestinal, también pueden infectar a las células epiteliales del intestino delgado (62). Después de la infección inicial las formas endógenas se desarrollan y diseminan la infección por todo el intestino delgado y grueso. A veces, también se infectan la mucosa gástrica, conducto biliar, vesícula biliar y epitelio del tracto respiratorio (véase Tabla I.3). Algunas especies de *Cryptosporidium* atacan preferentemente a la mucosa gástrica del ratón (*C. muris*), otras el *abomaso* de rumiantes (*C. andersoni*) y otras el tracto respiratorio aviar (*C. bailey*). La invasión y colonización de la superficie epitelial del intestino altera y desplaza el borde en cepillo, con pérdida de superficie y acortamiento y fusión de los *villi*, lo que causa un defectuoso transporte de nutrientes y electrolitos. Por todo ello la criptosporidiosis cursa con malabsorción y diarrea.

Estudios epidemiológicos moleculares han demostrado la presencia en la especie humana de, al menos, dos genotipos singulares y distintos de *C. parvum*,

Tabla I.3. *Especificidad tisular de diferentes especies de Cryptosporidium*.*

Especies	Hospedadores	Tejidos principales	Tejidos secundarios
C. hominis	Humanos	Intestino delgado, intestino grueso	Estómago, conducto biliar y vesícula biliar
C. parvum	Humanos, Bovinos, Ovinos, Caprinos, Cerdos y Ratones	Intestino delgado	Estómago, conducto biliar, vesícula biliar y tracto respiratorio
C. andersoni	Bovinos	Abomaso	
C. muris	Ratones	Intestino	
C. meleagridis	Gallinas, Pavos	Intestino, cloaca, bolsa de Fabricio	Molleja
C. baileyi	Gallinas	Tráquea, bronquios, pulmones, sacos aéreos	Intestino, cloaca, bolsa de Fabricio
C. serpentis	Reptiles	Estómago	
C. nasorum	Peces	Estómago, intestino	

* Fuente: Thompson *et al.* (51).

el genotipo humano (o genotipo 1) y el bovino (o genotipo 2) (66). El primero se ha reclasificado y denominado *C. hominis* (33) por una serie de razones: infecta solo a la especie humana, mientras que *C. parvum* lo hace, además de a los humanos, a vacunos, lanares, cabras, cerdos y ratones. Ambos genotipos muestran diferencias genéticas (66-68) y en los cerdos gnotobióticos los cursos de la enfermedad son distintos (55). Finalmente en infecciones mixtas por ambas especies no se ha observado intercambio de material genético alguno (9).

Súmese a lo dicho que su taxonomía es todavía bastante controvertida y que tampoco está clara la epidemiología de las distintas especies. Por tanto, se necesitan más estudios para confirmar la validez de las especies de *Cryptosporidium*, no solo con fines taxonómicos sino también para mejorar su diagnóstico y tratamiento (55).

La posibilidad actual de observar en cultivos *in vitro* todas las formas de su ciclo biológico ha puesto de manifiesto la existencia de otras nuevas, antes desconocidas, y asimismo ha permitido demostrar que no es un parásito intracelular obligado; Hijjawi *et al*. (62), comparando los ciclos biológicos de dos especies de gregarinas (*Mattesia dispora* y *M. geminate*) con el de *Cryptosporidium* observaron entre ellos muchas similitudes. Comentando estos resultados Thompson *et al*. (51) concluyeron que se necesitan análisis filogenéticos profundos del género *Cryptosporidium* y de otros miembros de los Apicomplexa, añadiendo después que, independientemente de que deban incluirse o no entre las gregarinas, también hay que investigar si pertenece a un posible orden nuevo, dentro de los Apicomplexa. Hoy se admite que *Cryptosporidium* es una mezcla fenotípica y genotípicamente heterogénea de especies y de genotipos morfológicamente idénticos.

I.5.2. Caracterización y especies de Cryptosporidium

La adscripción de especies del género *Cryptosporidium* se basaba inicialmente en caracterísiticas fenotípicas como especificidad de hospedador y morfología de los ooquistes. No debe extrañar, por tanto, que la falta de caracteres morfológicos capaces de diferenciar especies diera lugar a una gran controversia sobre si las diferencias fenotípicas eran *verdaderas* y reflejo de las genéticas, o meramente consecuencia de los cambios inducidos por el medio ambiente y los hospedadores.

La caracterización genética con técnicas específicas y fiables como la reacción en cadena de la polimerasa, acoplada al polimorfismo de restricción de

la longitud del fragmento (PCR-RFLP) y la secuencia analítica se usaron, a finales del siglo pasado, para diferenciar los aislamientos de *Cryptosporidium* y para confirmar la validez de las especies de este género. Los análisis de la subunidad pequeña del gen del DNA ribosómico (18S rDNA) han puesto de manifiesto la existencia de distintos genotipos llamados, arbitrariamente, tipos "humano", "bovino", "vacuno", "porcino", "felino", "murino", "canino", "simio", "hurón", y "marsupial" (67, 70). Análisis posteriores han demostrado que los genotipos humano, bovino, felino y canino son especies diferentes, pero todavía no puede afirmarse que el resto de los genotipos constituyan una sola especie. La valoración y en su caso separación de estas especies y genotipos, requiere el apoyo de investigaciones morfológicas, biológicas (fenotípicas) y genéticas.

Se han realizado análisis secuenciales de genes adicionales, que han permitido diferenciar diversas especies de *Cryptosporidium* (como *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. bailey*, *C. muris*, *C. felis*, *C. serpentis*, y *C. wrairi*) y distintos genotipos de *C. parvum* (porcino, hurón, simio). Así, los análisis filogenéticos basados en los genes 18S rRNA y HSP70 indican que al género *Cryptosporidium* pertenecen dos grupos principales, a saber, uno formado por *C. muris* y *C. serpentis* y otro constituido por *C. hominis*, *C. parvum*, *C. bailey*, *C. felis*, *C. canis* y *C. meleagridis* (67, 70, 71). Las variedades alelas de sus *loci* también indican una significativa heterogeneidad intraespecífica en *C. parvum*, lo que demuestra que múltiples genotipos de *C. felis*, *C. canis* y *C. bailey* difieren de los principales *clados* (del griego *klados* = grupo) de *C. parvum*, por lo que, consiguientemente, se han clasificado como especies distitntas. Por otra parte, basándose en sus caracterísiticas biológicas o fenotípicas el *cluster* de *C. meleagridis* y *C. wrairi*, junto con *C. parvum*, se admite que son especies distintas. Xiao *et al*., publicaron en 2004 una excelente revisión de estos aspectos, cuya lectura se recomienda (41).

Los estudios de genes simples y el genotipado multilocal de los aislamientos de diversas regiones geográficas (América del Norte y del Sur, Europa, Australia, Kenia) y de sus hospedadores han puesto de manifiesto la considerable diversidad interespecífica (caso de aislamientos de *C. parvum*, *C. hominis*, *C. wrari*, *C. muris* y *C. serpentis*), la diversidad entre los aislamientos humanos y animales, así como la gran identidad intraespecífica, especialmente entre *C. parvum*, *C. hominis* y C. *wrari*. Estos resultados se observaron a lo largo y ancho de los países estudiados (72-74).

Si, como sostienen Ramírez *et al*. (55), se consiguiese un acuerdo general sobre los criterios que deben reunir las especies criptosporidiósicas para

situarlas en el género que les corresponda, esto ayudaría mucho a los médicos, veterinarios y epidemiólogos en la evaluación del impacto de cada una de ellas en la salud humana y animal, en el establecimiento de su potencial zoonósico, en el conocimiento de sus mecanismos de transmisión y en las medidas profilácticas y de control que deben tomarse para bien de la Salud Pública.

I.6. INFECCIONES HUMANAS POR CRYPTOSPORIDIUM

El agua contaminada con *Cryptosporidium* es la fuente de contagio más importante de la especie humana. Se han descrito varios brotes de criptosporidiosis debidos a la ingestión de agua contaminada de los depósitos de abasto municipales y de las piscinas de zonas de recreo (19, 22). El brote humano más grave, que afectó a más de 400.000 personas, tuvo lugar en Milwaukee (Wisconsin, EE.UU.) en 1993 (véase Tabla I.1). La criptosporidiosis se presenta en las personas como una diarrea que dura de 8-15 días y termina con la curación, sin otro cuidado que evitar la deshidratación de los enfermos. Sus principales síntomas son diarrea acuosa acompañada de dolores cólicos abdominales, anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos, cansancio y fiebre escasa (75). La sintomatología de los niños es similar a la de los adultos, si bien la criptospiridiosis infantil puede causar secuelas en el crecimiento y desarrollo (76). Sin embargo, los hospedadores inmunodeprimidos por diferentes causas, como los sometidos a transplantes de órganos, quimioterapia anticancerosa, drogadictos y otros, y singularmente los enfemos de HIV y SIDA son los de peor pronóstico (77). Por lo tanto, la gravedad y duración de la criptosporidiosis depende del estado inmunitario del hospedador. Se ha visto que los pacientes inmunodeprimidos, con recuentos de linfocitos T CD4+, menores de 150/mL, desarrollan una severa diarrea que puede terminar con la vida del paciente. En *C. parvum* la virulencia varía de unas cepas a otras, lo que demostraron Tzipori y Ward (78) con voluntarios infectados, en los que estudiaron la tasa y persistencia de la diarrea. Vieron que las cepas variaban en poder infectivo y observaron que unas producían síntomas más severos y duraderos que otras, por lo que concluyeron que *Cryptosporidium* presenta múltiples factores de virulencia.

Señalemos para terminar este punto, que son nueve, los genotipos diferentes que atacan a la especie humana (Tabla I.4). Salvo *C. parvum* (genotipo porcino) y *C. muris*, se ha visto que todos los demás originan la enfermedad no

solo en pacientes seropositivos al virus de la inmunodeficiencia humana, sino también en niños y adultos inmunocompetentes. En EE.UU. la mayoría de los casos de criptosporidiosis humana se deben a *C. hominis* (> 75%) (66, 77), mientras que en RU el 61.5% los causa *C. parvum* genotipo bovino y el 37.8% los produce *C. hominis* (78). Como sucede en EE.UU., en Australia, Kenia, Guatemala y Perú el genotipo humano es el predominante, pues es responsable del 85-92% de las criptosporidiosis humanas (79, 80).

Tabla I.4. *Especies y genotipos de Cryptosporidium responsables de las criptosporidiosis humanas (Ramírez et al. (55)).*

Especie	Autores	Referencia
*C. hominis**	McLauchlin *et al.,* 2000	80
	Xiao *et al.,* 2001	16
	Morgan-Ryan *et al.,* 2002	33
C. parvum		
Genotipo bovino	Xiao *et al.,* 2001	16
Genotipo porcino	Xiao *et al.,* 2002	64
Genotipo cervino	Ong *et al.,* 2002	65
Genotipo simio	Mallon *et al.,* 2003	74
C. meleagridis	Morgan *et al.,* 2000	46
	Xiao *et al.,* 2001	16
	Pedraza-Díaz *et al.,* 2001	121
C. felis	Pieniazek *et al.,* 1999	44
	Pedraza-Díaz *et al.,* 2001	121
	Morgan *et al.,* 2000	46
C. canis	Pieniazek *et al.,* 1999	44
	Xiao *et al.,* 2001	16
	Pedraza-Díaz *et al.,* 2001	121
C. muris	Katsumata *et al.,* 2000	35
	Gatei *et al.,* 2003	69
	Palmer *et al.,* 2003	70

* Antes se conocía como *C. parvum,* genotipo humano, o *C. parvum* genotipo 1.

I.7. CRIPTOSPORIDIOSIS DE LOS ANIMALES

A medida que fueron conociéndose los brotes humanos de criptosporidiosis, aumentó el interés de la medicina veterinaria por esta parasitosis, no solo por el rol desempeñado por los animales como fuentes de la infección humana, sino también por las pérdidas económicas que acarrea su presencia en los de renta y por el reto que suponía su prevención y control. Hoy se sabe que son sensibles a la misma la mayoría de los animales de compañía, los de renta (tanto mamíferos como aves de abasto), muchos de los silvestres en su ambiente natural y los confinados en parques zoológicos.

I.7.1. Critposporidiosis del ganado vacuno

En el ganado vacuno se han hallado dos especies de *Cryptosporidium*, *C. parvum* y *C. andersoni*, si bien en 2004 Santin *et al*. (82) encontraron un nuevo genotipo de *C. parvum*. Precisamente el enteropatógeno más corriente de los terneros, en su primera semana de vida, es *C. parvum*, que puede ir acompañado de otros patógenos, como virus, bacterias y *Giardia*.

Los terneros infectados suelen iniciar la difusión de ooquistes de *C. parvum* a los 2 días de edad (83), si bien lo más corriente es que ocurra cuando tienen entre 1 y 4 semanas, durando la infección unas dos semanas. La enfermedad se manifiesta por una diarrea (generalmente de color amarillo pálido, con mucosidad y a veces muy acuosa), acompañada de depresión, anorexia y dolor abdominal. Frecuentemente se complica por los patógenos concurrentes, como virus (rotavirus y otros), bacterias (*E. coli* y *Salmonella* principalmente) y protozoos (*Giardia*). Los terneros mueren por deshidratación y colapso cardiovascular. En las granjas con criptosporidiosis endémicas la morbilidad alcanza el 100% pero la mortalidad es muy escasa o ausente. Los anticuerpos del calostro y de la leche protegen a los terneros neonatos al bloquear la invasión parasitaria e inmovilizar en el lumen intestinal a las formas criptosporidiósicas. Los micronutrientes influyen en el curso de la enfermedad (p. ej., la deficiencia de Se lo empeora), como han confirmado Huang y Yang en animales modelo (84).

La gran concentración de ooquistes en las granjas superpobladas influye en la mayor incidencia de criptosporidiosis. Otro factor de riesgo que actúa aumentando la probabilidad de difusión de los ooquistes son las operaciones de limpieza de la yacija del establo y de las excretas pues si los operarios que las llevan a cabo, no atienden bien a su desinfección y a la de su utillaje (horquillas,

cepillos, carretillas, etc.) se convierten en agentes activos de difusión (85). Las granjas cuyo aporte principal de agua procede de pozos tienen menores concentraciones de parásitos que las que utilizan como abrevaderos zanjas, balsas o pequeños regatos (86). La contaminación de los abrevaderos por defecación de los animales parasitados en su entorno da lugar a infecciones en otras reses, por lo tanto, es otro factor a tener en cuenta.

La leche puede contaminarse por una higiene defectuosa de las ubres de las vacas de ordeño y ya se han señalado brotes humanos de criptosporidiosis por el consumo de lehe cruda (87, 88). De aquí la conveniencia, una vez más, de someter la leche antes de su venta a temperaturas y tiempos de pasteurización.

I.7.2. Criptosporidiosis de lanares y cabras

Los responsables de las criptosporidiosis de ovejas y cabras son *C. parvum* y su nuevo genotipo (89, 90). La especie *C. andersoni* no afecta a ovejas y cabras ya que se limita al abomaso de los bovinos (véase Tabla I.3). El periodo prepatente en los pequeños rumiantes es de 4 días y como sucede con el ganado vacuno, corderos y cabritos presentan un cuadro clínico más severo que las ovejas y cabras adultas. Cuando más frecuentemente enferman es entre la 1ª y la 5ª semana después del nacimiento. La infección se transmite de animal a animal siguiendo la ruta fecal-oral, especialmente cuando ocupan espacios con demasiados animales/m^2 (91). El síntoma más llamativo es una diarrea, de suave a severa, apreciándose además, otros signos como depresión, anorexia y dolor abdominal. La diarrea, de color amarillo, presenta un aspecto que va de sólido blando a líquido acuoso, desprendiendo un fuerte olor desagradable. El recuento de ooquistes en las heces es muy alto, 10^8-10^9/g. Con bastante frecuencia y como ocurre en los terneros, a la sintomatología clínica colaboran otros microorganismos patógenos, como los víricos (rotavirus), bacterianos (*E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, etc.) y protozoos (*Giardia*, *Eimeria*). Son precisamente estas infecciones mixtas las que mayor mortalidad presentan.

I.7.3. Criptosporidiosis porcina

Contrariamente a lo que sucede en los rumiantes, las criptosporidiosis de los cerdos son asintomáticas y, a veces, incluso lo son las de animales jóvenes, siempre, claro está, que no experimenten un estrés intenso o sufran inmunodeficiencia.

Los cerdos pueden infectarse de forma natural con *C. suis* y *C. parvum*, pero experimentalmente también con *C. hominis* (92, 93). Los lechones lactantes muy raras veces sufren criptosporidiosis, lo que sugiere que los anticuerpos de la leche materna los protegen de alguna manera, en cambio la infección aparece muy pronto después del destete (94). De todos modos, se han señalado algunas infecciones testimoniales en muchas localidades repartidas por todo el mundo, la mayor parte de las veces asociadas a otras diarreas concurrentes de diversa morbilidad.

En el Sur de California se ha observado una prevalencia del 5% en lechones recién destetados y en cerdos "de matadero". Tanto cerdos clínicamente sanos, como los que sufrían diarreas, presentaban ooquistes en las heces (95). En Canadá la prevalencia en los cerdos de matadero es del 11% (96), en Trinidad y Tobago llega al 19.6% (97) y en Aragón, según Quilez *et al*. (98), alcanza un 21.9%; sin embargo, en la mayor parte de los cerdos adultos la infección es asintomática, lo que no sucede en lechones de 1-2 meses.

I.7.4. Criptosporidiosis equina

Lo mismo que en los cerdos adultos, las criptosporidiosis de los équidos son asintomáticas y suelen observarse en potros de 5-8 semanas de edad. La prevalencia de esta parasitosis inaparente varía mucho de unos países a otros. En el RU afecta al 6.4% de su población equina (99), en Polonia al 9.4% (100) y en Canadá (96) al 17%. En EE. UU. los porcentajes de prevalencia más altos se han señalado en Louisiana donde llegan al 100% (191) y en Ohio y Kentucky alcanzan, respectivamente, 15 y 31% (102).

Los équidos sometidos a estrés severo y los inmunodeficientes, como los potros con inmunodeficiencia combinada grave (SCID), presentan diarreas que pueden ser fatales (103). Los episodios diarréicos son causados por *C. parvum* (104) y hasta ahora no se ha caracterizado una cepa específica de los équidos.

Dado el uso actual de los caballos en excursiones recreativas, carreras y concursos hípicos, hipoterapia, etc., debería profundizarse más en el conocimiento del papel zoonósico de los équidos en la difusión y transmisión de *Cryptosporidium* a la especie humana.

I.7.5. Criptosporidiosis aviar

Actualmente sólo se reconocen como especies responsables de criptosporidiosis aviar a *C. meleagridis* y *C. baileyi* (51, 55). La criptosporidiosis se ha descrito

en muchas aves domésticas y silvestres: gallinas, pavos, patos, gansos, codornices, faisanes y pavos reales (105).

C. meleagridis produce infecciones asintomáticas en las gallinas, pero a los pavos les causa ocasionalmente diarreas, algo semejante ocurre en la especie humana, en la que origina la enfermedad, lo que sugiere que dispone de factores de virulencia nuevos y es capaz de atravesar las barreras interespecíficas. Así se deduce de un trabajo reciente (106) donde se comprobó que un aislamiento de *C. meleagridis*, de origen humano, producía experimentalmente la enfermedad en gallinas, ratones, lechones y terneros.

I.7.6. Criptosporidiosis de los animales silvestres

El rol de los animales silvestres como reservorios de criptosporidios de la especie humana y animales de renta y de compañía, aunque presenta ciertas lagunas, está bien docuentado (26). *C. parvum* se ha detectado en ratones silvestres (107), ciervos (108), jabalíes (109), conejos silvestres (110), zorros (26), ardillas (111), ardillas rojas (*Tamias* sp) y rata almizclada (*Ondatra zibethica*) (108). Las criptosporidiosis de estos animales son asintomáticas y algunos de ellos comparten hábitat con los animales de renta, por lo que además de fuentes adicionales de contaminación del medio ambiente, sirven de posibles agentes de contagio del ganado.

Los animales silvestres, como se dice más atrás, contaminan las aguas superficiales. En el RU una quinta parte de los ooquistes de las aguas de drenaje de fincas agrarias procede de los animales silvestres (14). El genotipo cervino de *C. parvum* se ha encontrado en corrientes de agua que contribuyen a los abastecimientos municipales (15). Por ello no debe sorprender la presencia en hombres y animales domésticos de infecciones causadas por nuevos genotipos de *C. parvum* procedentes de animales silvestres.

El ganado vacuno contribuye a la difusión de ooquistes de *C. muris* pero se desconoce su patogenicidad. La infección es asintomática en ratones mayores de 10 días y se ha comprobado que se limita al estómago (107). En el ganado vacuno adulto, infectado con *C. muris* se ha observado debilidad, menor producción de leche y criptosporidiosis abomasal crónica (112). La presencia de ooquistes de *C. muris* en las heces, en el estiércol y en las aguas superficiales indica una transmisión de la infección de los roedores silvestres a los animales de renta. Además se han comprobado casos de infección humana por *C. muris*, lo que sugiere que los roedores silvestres también podrían ser una fuente de con-

tagio para la especie humana (35). De aquí que el papel de los animales silvestres en la transmisión de criptosporidiosis a los hombres y al ganado requiera más investigaciones.

I.7.7. Criptosporidiosis de los animales de compañía

Las personas conviven con sus animales de compañía y comparten con ellos su espacio vital y consecuentemente, algunos de sus parásitos. En los EE.UU. son más de 58 millones los hogares que acogen como mascotas a perros, gatos, pájaros, cricetos (o hámsteres) e incluso peces, lagartos, serpientes y otros muchos animales. En perros, gatos y otros animales de compañía se han descrito diversas especies de criptosporidiosis (46). La criptosporidiosis canina generalmente es asintomática y en los perros menores de 6 meses su presentación es más frecuente que en los adultos (45, 114). En cambio, Hill *et al*. (117) comprobaron en gatos con criptosporidiosis, que el 50% presentaban diarreas.

En personas adultas con buen estado de salud no hay pruebas que indiquen una posible transmisión zoonósica de la criptosporidiosis a partir de los animales de compañía, sin embargo sí se ha descrito la transmisión del biotipo bovino de *C. parvum* (de gatos y perros) a personas enfermas de HIV (118). De otra parte, diversas especies de criptosporidios, como *C. felis*, *C. canis* y *C. meleagridis*, han infectado a personas adultas y niños (120, 121), si bien no se ha identificado la ruta de transmisión. Aunque preocupe el contagio de la criptosporidiosis a partir de los animales de compañía, tal preocupación es mucho mayor en el caso de niños, ancianos y sujetos inmunodeprimidos (121).

I.7.8. Criptosporidiosis en los reptiles

Desde que Brownstein *et al*. (120) observaron por primera vez la enfermedad en serpientes, en 1977, son bastantes las especies de otros reptiles, incluídos lagartos y tortugas, en los que se han diagnosticado infecciones por *C. serpentis* (122). La criptosporidiosis de reptiles es de curso crónico y los animales enfermos muestran signos de alteración gástrica, además de anorexia y pérdida de peso. La excreción de ooquistes con las heces varía, de unos pocos meses, hasta dos años.

Contrariamente a lo que sucede en mamíferos y aves, los reptiles adultos son afectados más frecuentemente que los jóvenes. La transmisión de la enfer-

medad podría atribuirse a la ingestión de sus presas, pero no de ratas y ratones, ya que los intentos de hacerlo experimentalmente alimentándolos con ratones infectados con *C. serpentis* han fracasdo.

I.7.9. Criptosporidiosis de los peces

Son pocas las publicaciones sobre criptosporidiosis de los peces, no obstante, se han descrito casos de infecciones por *C. nasorum* en peces ornamentales y de acuarios (123), en dos especies de pez gato del género *Plecostomus* (124) y en doradas (*Sparus aurata*) y lubinas (*Dicentrarchus labrax*) (125). Los parásitos se detectaron en el estómago, tracto intestinal y región cloacal. Hasta ahora no se ha señalado la infección humana por *C. nasorum*, lo que sugiere que el pescado no es una buena fuente de criptosporidios para el hombre.

En cambio en ostras (126), almejas (127) y mejillones se han hallado ooquistes de *C. parvum* y *C. hominis* que se sitúan preferentemente en los hemocitos, branquias y contenido intestinal, donde permanecen, con capacidad infectiva, al menos una semana (128). Estos estudios indican que, tanto el marisco como el pescado, procedente de aguas contaminadas con ooquistes, podrían ser un peligro para la salud pública.

I.8. DIAGNÓSTICO

Son muchas las pruebas propuestas para detectar la presencia de especies de *Cryptosporidium*; la mayoría se basan en la observación microscópica directa de extensiones de tejidos o heces debidamente teñidas (129). La tinción ácido resistente modificada (AF), se ha usado mucho por ser barata y fácil de realizar, sin embargo, su sensibilidad con las heces es escasa, pero puede aumentarse de 10 a 100 veces, observando las preparaciones bajo luz UV y con filtro de rodamina de 540-560 nm (130).

También se han desarrollado diversas técnicas de inmunomarcado, que utilizan anticuerpos mono o policlonales, pero son más caras que las de tinción tradicionales y su sensibilidad y especificidad viene a ser la misma (131). Ahora se dispone comercialmente de inmunoensayos rápidos que requieren escasa experiencia, por ejemplo, el *Beckton Dickinson Color PAC* y *BIOSITE Diagnostics Triage Parasite Panel* (132, 133). Estos ensayos no sustituyen a los métodos de diagnóstico rutinario, pero por su gran sensibilidad y especificidad po-

drían ser útiles para confirmar las infecciones por especies de *Cryptosporidium* en enfermos con un número pequeño de parásitos y para difenciar al género *Cryptosporidium* de otros protozoos que también son transmisibles por el agua, como *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*/*E. dispar*.

Se ha dicho en el apartado I.5.2. que las técnicas de PCR son muy específicas y de una gran sensibilidad. Se ha comprobado que las de amplificación de la PCR, cuya diana son los genes que codifican la proteína de la pared de los ooquistes, la subunidad pequeña de rRNA, β-tubulina, TRAP-C1 y TRAP-C2, ITS1, politreonina repetida (Poli-T), dihidrofolato reductasa (DHFR), secuencias desconocidas de DNA y mRNA de las proteínas sometidas a *shock* térmico, son muy útiles en la detección y diferenciación de especies de *Cryptosporidium* (135).

Las técnicas moleculares combinadas, como la amplificación de la PCR acoplada con el análisis del polimorfismo de restricción de la longitud del fragmento (RFLP), permiten obtener información sobre los genotipos y especies de *Cryptosporidium* presentes en tejidos y heces *animales*. Carey *et al*. (134) han usado estas técnicas como métodos rápidos y seguros, para detectar ooquistes viables, tanto en pacientes de criptosporidiosis, como en las aguas de abastecimiento.

I.9. TRATAMIENTO

La rehidratación oral o intravenosa y el aporte de electrolitos es el tratamiento síntomatico más sencillo e importante hasta que los enfermos (humanos o animales) adquieren suficiente inmunidad específica; generalmente se completa con antidiarréicos inespecíficos (caolín, pectina y loperamida). Son muchos los quimioterápicos ensayados contra la criptosporidiosis, pero ninguno ha respondido con la eficacia deseada (152). Tan pobre respuesta la explica Sterling (136) por la singular ubicación intracelular del parásito que le permite utilizarla como "mecanismo de escape" y como protección contra los fármacos anticriptosporidiósicos.

En el año 2002, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA) aprobó el uso en Pediatría del fármaco nitazoxanida (NTZ, Alinia™) para tratar la diarrea infantil, en niños de 1-11 años debida a *C. parvum* y *Giardia lamblia*. La eficacia de este antiprotozooario sintético se estudió en niños con ensayos doble ciego y control de placebo; se observó una duración más corta de la diarrea y un tiempo de excreción de ooquistes con las heces más breve (137, 138), pero su seguridad y eficacia en los adultos y en pacientes inmunodeficientes, no se ha establecido todavía (139). Lo que sí se ha visto (140)

es que algunos antirretrovirales inhibidores de la proteasa, como el Indinavir actúan directamente en *C. parvum* interfiriendo su ciclo biológico.

En la Tabla I.5 se señalan algunos medicamentos cuyo uso clínico ha demostrado que son eficaces contra algunas criptosporidiosis. Los antibióticos ami-

Tabla I.5. *Fármacos clínicamente eficaces en el tratamiento de las criptosporidiosis.*

Fármaco	Nombre comercial	Dosis humanas	Dosis animales	Bibliografía
Paramomicina	Humatina	500-750 mg PO, bid/qid (adultos) 25-35 mg/kg/día PO tid dividido (Pediátricas)	Terneros: 100 mg/kg/día PO Corderos: 100-200 mg/kg/día PO Cabritos: 100 mg/kg/día PO	(144), (146), (147), (148)
Azitromicina	Zitromax	500 mg PO quid (adultos)		(144)
Roxitromicina	Numerosos	300 mg bid PO (adultos)		(149)
Lactato de Halofuginona	Halocur		Terneros, corderos, cabritos 100 mg/kg/sid, durante 7 días	(150), (151)
Nitazoxanida	Alinia	100-200 mg PO (adultos)		(138)
Letrazuril		50-100 Mg/día (adultos)		(153)
Decoquinato	Deccox		Terneros: 2.5-10 mg/kg Cabras: 2,5 mg/kg	(151), (154)
β-ciclodextrina			Ovejas: 500 mg/kg/sid, 3 días	(138)
Yemas de huevos superinmunes		60 mL/día durante 3 semanas		(155)
Anti *Cryptosporidium* bovino		20 mL/h durante 10 días	Terneros: 200 mL bid	(156), (157), (158), (159)
Inmunoglobulina		20-80 g/día	Corderos: 50 mL bid	

Fuente: Thompson *et al.* (51).
Abreviaturas latinas y su significado: *bid (bis in die)* = dos al día; *PO (per os)* = Vía oral; *sid (semel in die)* = una al día; *tid (ter in die)* = tres al día.

noglicósidos, como la paromomicina en los terneros y ratones infectados con *C. parvum* y en las aves parasitadas con *C. baileyi*, disminuyen la duración del periodo latente, la difusión de ooquistes y los síntomas clínicos (141). La administración, durante 2-3 días, de dosis relativamente grandes (6-15 mg/kg peso vivo/día) de lasalocid —un antibiótico ionóforo poliéter— constituyó un tratamiento eficaz de la criptosporidiosis aguda de terneros muy jóvenes (142), pero suministrado durante dos semanas a dosis profilácticas (8 mg/kg peso vivo/día) resultó muy tóxico (143). Dosis menores de lasalocid no mostraron eficacia alguna frente a infecciones por *C. parvum*.

La azitromicina (un antibiótico macrólido), sola o combinada con la paromomicina, mejora en la especie humana los síntomas clínicos (144). La β-ciclodextrina (un excipiente usado en la industria farmacéutica para mejorar la estabilidad y solubilidad de ciertos fármacos), la utilizaron con éxito Castro Ermida y colaboradores (145) para tratar ratones infectados experimentalmente y corderos que se infectaron de forma natural. Se admite que actúa eliminando los ooquistes y otras formas extracelulares parásitas al provocar una diarrea osmótica.

También se han ensayado otras terapias alternativas, como el suero hiperinmune y el calostro bovino hiperinmune que contienen anticuerpos contra las proteínas de superficie de *C. parvum*; frente a esporozoitos se han ensayado, asimismo, anticuerpos monoclonales (160, 161). La administración de probióticos se ha comprobado que reduce la duración del curso clínico y el recuento de ooquistes, eliminados por ratones infectados experimentalmente (162, 163). Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que los caldos de cultivo de bacterias lácticas, libres de células, reducen significativamente la viabilidad de los ooquistes (164). Aunque no se conocen suficientemente los mecanismos implicados en la protección contra las criptosporidiosis, los estudios realizados sugieren que las bacterias probióticas podrían usarse como agentes terapéuticos frente a las especies de *Cryptosporidium* (162).

I.10. INMUNOPROFILAXIS

La vacunación con proteínas implicadas en la patogénesis de los criptosporidios (por ejemplo, glicoproteínas GP40, GP47, GP15, CS4, etc.), aunque no es una práctica corriente, constituye todavía una estrategia atractiva en la lucha contra las criptosporidiosis (165). Se admite que ambas respuestas inmunes, la humoral y la mediada por células, están implicadas en la eliminación de los crip-

tosporidios. Se ha observado que los hospedadores infectados, en buen estado de salud, esto es, con ambos sistemas inmunes intactos son muy resistentes a la reinfección y a desarrollar un cuadro clínico.

En las especies ganaderas y en ciertas poblaciones humanas, la inmunoprofilaxis es la estrategia preferida pero en la industria farmacéutica todavía no se dispone de vacunas para la venta. Se admite que la inmunidad mediada por células es el sistema fundamental para eliminar de los hospedadores las especies de *Cryptosporidium* que albergan (166). Esto se ha comprobado en modelos animales carentes de algunos elementos de su sistema inmune (por ejemplo, ratones SCID) y también supervisando la respuesta inmune a hospedadores con deficiencias en su sistema inmunitario, mediado por células, a causa de defectos genéticos, infecciones, etc. (166). La respuesta humoral es menos importante a este respecto, Dann *et al*. (167) han demostrado en animales y en voluntarios humanos respuestas específicas anticuerpo-parásito, sin eliminación de parásitos, pero en otros estudios la resistencia a la infección la han atribuído a respuestas locales debidas a IgA e IgM (166).

Se ha demostrado (véase más atrás) que los anticuerpos policlonales del suero y del calostro hiperinmune reducen la difusión de ooquistes. En terneros y corderos neonatos los anticuerpos ingeridos con el calostro, atravesando la mucosa intestinal, pasan a la circulación durante las primeras 24 horas de vida y más tarde se secretan en la luz intestinal, proporcionando una inmunización pasiva que dura 1-2 meses. La protección de los terneros recién nacidos se logró con anticuerpos policlonales IgG contra ooquistes completos con los antígenos P23, CP5/60 y CP15 antes citados. También se ha visto que la inmunización pasiva con suero hiperinmune proporciona respuestas clínicas en voluntarios humanos y modelos animales crónicamente infectados (166, 168). En resumen, aunque son limitados los trabajos de este tipo, se piensa que los anticuerpos específicos contra *Cryptosporidium,* uniéndose a una o más formas criptosporidiósicas extracelulares, previenen la invasión de los enterocitos y su unión a los mismos.

El vacunar a los animales muy jóvenes, cuyo sistema inmune no está suficientemente formado, no es de recomendar. En el caso de grandes masas animales la vacunación es cara y por otra parte los animales adultos sanos, mantenidos en buenas condiciones higiénicas, en caso de enfermar, en muy raras ocasiones mueren. Nuestras lagunas de conocimiento en la respuesta inmune del hospedador frente a la infección, son barreras que hay que superar para desarrollar una terapéutica eficaz contra la criptosporidiosis.

I.11. PREVENCIÓN Y CONTROL

Las medidas preventivas son, sin ningún género de dudas, la mejor táctica a seguir para el control de los criptosporidios. Así se comprobó en el RU, donde, como hemos dicho, disminuyeron mucho los casos de criptosporidiosis humana durante la epizootía de fiebre aftosa (FA) de 2001 (169). Para erradicar esta grave enfermedad, se limitó el acceso de las personas a las explotaciones ganaderas, se restringieron los mercados de ganado, se evitaron los desplazamientos animales y se sacrificaron todas las cabezas enfermas de FA. De esta manera, no sólo se acabó con la fiebre aftosa, sino que se redujo significativamente la criptosporidiosis humana que fue un 81.8% menor en 2001 que en el año precedente (170). Estos trabajos son también una clara evidencia en favor de la transmisión zoonósica que constituye, de hecho, la principal ruta de contagio de la criptosporidiosis humana.

Puesto que la fuente de contagio de la infección humana más abundante son los abastecimientos de agua municipales, la implementación de medidas para disminuir la difusión de ooquistes por el medio ambiente requiere una atención especial. Por ejemplo, la identificación de los factores de riesgo de infección del ganado permitirá gestionar y desarrollar estrategias para evitar la difusión de ooquistes. Las medidas higiénicas que se apliquen al ganado y a su entorno y la higiene personal de quienes entren en contacto con él son fundamentales para evitar el contagio. Se procurará destruir los posibles ooquistes de establos, vallas, puertas y cercados donde viven y se alimentan los animales. Los ooquistes de las superficies se destruyen aplicándoles una solución de amoníaco al 5% (a ser posible en caliente) (17). El aislamiento de los animales y el asegurarse que los recién nacidos ingieren suficiente calostro son buenas medidas para controlar la difusión de la enfermedad (158).

Otras medidas para disminuir el contagio entre animales consisten en limitar el número de cabezas por metro cuadrado de superficie, mantener los animales jóvenes separados de los adultos, minimizar el contacto entre personal y terneros a su cuidado y procurar que la época de paridera sea corta y no dure varios meses. Así se reducen las oportunidades de difusión de ooquistes por las granjas y pastizales del entorno.

Los alimentos manipulados por operarios que albergan especies de *Cryptosporidium* y los expuestos al agua contaminada con ooquistes han sido fuentes de contagio humano (12, 13). Los alimentos vegetales procedentes de suelos abonados con estiércol también son fuente de contagio si se consumen crudos o poco hechos. Sin embargo, para la especie humana el agua contaminada es el

vehículo de transmisión de ooquistes más importante; permanecen viables en ella unos 140 días y son muy resistentes a la mayoría de los desinfectantes industriales (17) lo que hace muy difícil su destrucción por la cloración normal de las aguas. En los EE. UU. el 97% de las aguas superficiales que se recogen en las plantas de tratamiento y el 54% de las tratadas por filtración y cloración contienen un número pequeño de ooquistes de *Cryptosporidium* (21).

Las aguas de recreo (piscinas, estanques, fuentes y *jacuzzi*) pueden contaminarse, de forma excepcional, con vertidos y heces de animales o humanas (22). Los brotes debidos al agua suelen atribuirse a contaminaciones de origen pecuario y singularmente del ganado vacuno, debido a la gran prevalencia de la criptosporidiosis en los terneros, pero su infección —cuando se investigan los brotes— raras veces se confirma (22).

En resumen, los ooquistes se transmiten siguiendo la ruta fecal-oral, por contacto directo de hospedador-hospedador e indirectamente, vía los alimentos y el agua contaminados con ooquistes; también es posible la transmisión por inhalación —vía aerosoles— y por gotitas expulsadas al toser y estornudar (10). Por último se han señalado contagios de persona-persona, entre familiares, novios y otras parejas, entre niños de guardería y de primeros cursos de educación elemental que comparten pupitres y ocasionalmente, entre pacientes y personal hospitalario (6-11). El carácter zoonósico de las criptosporidiosis lo han confirmado una serie de estudios epidemiológicos con animales de compañía, animales de renta, animales silvestres y algunas infecciones contraídas accidentalmente por veterinarios, estudiantes y auxiliares de clínicas veterinarias (12-14).

I.12. BIBLIOGRAFÍA

1. Tyzzer, E. E. (1907) A sporozoon found in the peptide glands of the common mouse. *Proceedings of the Society of Experimental Biological Medicine*. **5:** 12-13.

2. Slavin, D. (1955) *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Pathology and Therapeutics*. **65:** 262-266.

3. Panciera, R. J., Thomassen, R. W. & Garner, F. M. (1971) Cryptosporidiosis in a calf. *Veterinary Pathology*. **8:** 479-484.

4. Current, W. L., Reese, N. C., Ernst, J. V., Bailey, W. S., Keyman, M. B. & Weinstein, W. M. (1983) Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *New England Journal of Medicine*. **308:** 1252-1257.

5. Mackenzie, W. R., Schell, W. L., Blair, K. A., Addiss, D. G., Peterson, D. E., Hoxie, N. J., Kazmierzak, J. J. & Davies, J. P. (1995) Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clinical Infectious Diseases*. **21:** 57-62.

6. Current, W. L. & Garcia, L. S. (1991) Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*. **4:** 325-358.

7. Mosier, D. A. & Oberst, R. D. (2000) Cryptosporidiosis. A global challenge. *Annual New York Academy of Sciences*. **916:** 102-11.

8. CDC Summary of Notifiable Diseases-United States (1998) MMWR. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. **47:** 1-92.

9. Pereira, S. J., Ramírez, N. E., Xiao, L. & Ward, L. A. (2002) Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *Journal of Infectious Diseases*. **186:** 715-718.

10. Hojlyng, N., Holten-Andersen, W. & Jepsen, S. (1987) Cryptosporidiosis: a case of airborne transmission. *Lancet*. **2:** 271-272.

11. Anderson, B. C., Donndelinger, T., Wilkins, R. M. & Smith, J. (1982) Cryptosporidiosis in a veterinary student. *Journal of American Veterinary Medical Association*. **180:** 403-409.

12. Quiroz, E. S., Bern, C., MacArthur, J. R., Xiao, L., Fletcher, M., Arrowood, M. J., Shay, D. K., Levy, M. E., Glass, R. I. & Lal, A. (2000) An outbreak of cryptosporidiosis linked to a food handler. *Journal of Infectious Diseases*. **181:** 695-700.

13. Millard, P. S., Gensheimer, K. F., Addiss, D. G., Sosin, D. M. & Beckett, G. A. (1994) An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *JAMA*. **272:** 1592-1596.

14. Thompson, R. C. A. (2003) Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infectious. *Journal of Parasitology*. **89:** S134-S140.

15. Thompson, R. C. A. (2003) The zoonotic potential of *Cryptosporidium*. En *Cryptosporidium from Molecular to Disease* (Thompson, R. C. A., Armson, A. & Morgan-Ryan eds.). págs. 113-119. Amsterdam: Elsevier.

16. Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R. H. & Lal, A. A. (2001) Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases*. **17:** 72-97.

17. Campbell, I., Tzipori, A. S., Hutchison, G. & Angus, K. W. (1982) Effect of disinfectans on survival of *Cryptosporidium* oocysts. *Veterinary Record*. **111:** 414-415.

18. CDC (1997) Outbreak of cryptosporidiosis associated with a water spinkler fountain-Minnesota. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. **47 (1998):** 856-860.

19. CDC (2000) Protracted outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming pool use-Ohio and Nebraska. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. **50 (2001):** 406-410.

20. Le Chavallier, M. W., Norton, W. D. & Lee, R. G. (1991) Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium spp.* in surface water supplies. *Applied Environmental Microbiology*. **57:** 2610-2616.

21. Le Chavallier, M. W., Norton, W. D. & Lee, R. G. (1991) *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in filtered water supplies. *Applied Environmental Microbiology*. **57:** 2617-2621.

22. Kramer, M. H., Sorhage, F. E., Goldstein, S. T., Dalley, E., Wahlquist, S. P. & Herwaldt, B. L. (1998) First reported outbreak in the United States of cryptosporidiosis associated with a recreational lake. *Clinical and Infectious Diseases*. **26:** 27-33.

23. El-Ahraf, A., Tacal Jr. J. V., Sobin, M., Amin, M., Lawrence, W. & Wilcke, B. W. (1991) Prevalence of criptosporidiosis in dogs and humans beings in San Bernardino County, California. *Journal of American Veterinary Medical Association*. **198:** 631-634.

24. Mtambo, M. M., Nash, A. S., Blewett, D. A., Smith, H. V. & Wright, S. (1991) *Cryptosporidium* infection in cats: prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area. *Veterinary Record*. **129:** 502-504.

25. Simpson, V. R. (2002) Wild animals as reservoirs of infectious diseases. *Veterinary Journal*. **163:** 128-146.

26. Sturdee, A. P., Chalmers, R. M. & Bull, S. A. (1999) Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. *Veterinary Parasitology*. **80:** 273-280.

27. Tyzzer, E. E. (1912) *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archives für Protistenkunde.* **26:** 394-412.

28. Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A. & Yardley, J. H. (1976) Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. **70:** 592-598.

29. Kennedy, G. A., Kreitner, G. L. & Strafuss, A. C. (1977) Cryptosporidiosis in three pigs. *Journal of American Veterinary Medical Association*. **170:** 348-350.

30. Barker, G. A. & Carbonell, P. L. (1974) *Cryptosporidium agni* sp. nov. from a calf, with observations on the oocyst. *Zen Parasitenkd*. **44:** 289-298.

31. Tziperi, S., Smith, M., Makin, T. & Halpin, C. (1982) Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* sp. purified from calf faeces. *Veterinary Parasitology*. **11:** 121-126.

32. Snyder, S. P., England, J. J. & McChesney, A. E. (1978) Cryptosporidiosis in immunodeficient Arabian foals. *Veterinary Pathology*. **15:** 12-17.

33. Morgan-Ryan, U. M., Fall, A., Ward, L. A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R. C., Olson, M., Lal, A. & Xiao, L. (2002) *Crytosporidium hominis nov. sp.* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **49:** 433-440.

34. Tyzzer, E. E. (1910) An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medical Research*. 18.

35. Katsumata, T., Hosea, D., Ranuh, I. G., Uga, S., Yanagi, T. and Kohno, S. (2000) Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*. **62:** 70-72.

36. Hoover, D. M., Hoerr, F. J., Carlton, W. W., Hisman, E. J. & Ferguson, H. W. (1981) Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso liuratus* Bloch and Snider. *Journal of Fish Diseases*. **4:** 425-425.

37. Álvarez-Pellitero, A. & Sitja Bobadilla (2002) *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa; Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*. **32:** 1007-1021.

38. Morgan, U., Weber, R., Xiao, L., Sulaiman, I., Thompson, R. C., Ndiritu, W., Lal, A., Moore, A. & Deplazes, P. (2000) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. **38:** 1180-1183.

39. Current, W. L., Upton, S. J. & Haynes, T. B. (1986) The life cicle of *Cryptosporidium baileyi* nov sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting chicken. *The Journal of Protozoology*. **33:** 289-296.

40. Levine, N. D. (1980) Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *Journal of Parasitology.* **66:** 830-834.

41. Xiao, L., Ryan, U. M., Graczyk, T. K., Limor, J., Li, J., Kombert, M., Junge, R., Sulaiman, J. M., Zhou, L., Arrowod, M. I., Koudela, B., Modry, D. & Lal, A. A. (2004) Genetic diversity of *Cryptosporidium* sp in captive reptiles. *Applied Environmental Microbiology*. **70:** 891-899.

42. Vetterling, J. M., Jervis, H. R., Merril, T. G. & Sprinz, H. (1971) *Cryptosporidium wairi* sp n. from the guinea pig *Cavia porcellus*; with an emendation of the genus. *The Journal of Protozoology*. **18:** 243-247.

43. Iseki, M. (1979) *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Japanese Journal of Parasitology*. **28:** 285-307.

44. Pieniazek, N. J., Bornay, F. J., Slemenda, S. B., da Silva, A. J., Moura, I. N., Arrowood, M. J., Ditrich, O. & Addiss, D. G. (1999) New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerging Infectious Diseases*. **5:** 444-449.

45. Wilson, R. B., Holscher, M. A. & Lyle, S. J. (1983) Cryptosporidiosis in a pup. *Journal of the American Medical Association*. **183:** 1005-1006.

46. Morgan, U. M., Xiao, L., Monis, P., Fall, A., Irwin, P. J., Fayer, R., Denholm, K. M., Limor, J., Lal, A. & Thompson, R. C. (2000) *Cryptosporidium* spp in domestic dogs: the "dog" genotype. *Applied Environmental Microbiology*. **66:** 2220-2223.

47. Linsay, D. S., Upton, S. J., Owens, D. S., Morgan, U. M., Mead, J. R. & Blagburn, B. L. (2000) *Cryptosporidium anderosnii* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **47:** 91-95.

48. Koudela, B. & Modry, D. (1998) New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from lizards. *Folia Parasitologica*. **45:** 93-100.

49. Peng, M. M., Xiao, L. & Freeman, A. R. (1997) Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases*. **3:** 567-573.

50. Petry, F. (2004) Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microscopy and Microanalysis*. **10:** 586-601.

51. Thompson, R. C. A., Olson, M. E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M. S. & Enomoto, S. (2005) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology.* **59:** 77-158.

52. Zhu, G. (2004) Current progress in the fatty acid metabolism in *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **51:** 381-388.

53. Zhu, G. & Abrahamsen, M. S. (2004) *Cryptosporidium parvum* genomics: impact on research and control. En World Class Parasites: The Pathogenic Enteric Protozoa: *Giardia*, *Entamoeba*, *Cryptosporidium* and *Cyclospora* (Sterling, C. R. & Adam, R. D. eds.), Vol., pp. 153-163. Kluwer, Norwell, MA., USA.

54. Zhu, G., Li, Y., Cai, X., Millership, J. J., Marchewka, M. J. & Keithly, J. S. (2004) Expression and functional characterization of a giant Type I fatty acid synthase (CpFAS1) gene from *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **134:** 127-135.

55. Ramírez, N. E., Ward, L. A. & Srinand Sreevatsan (2004) A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*. **6:** 773-785.

56. Sibbley, L. D. (2004) Intracellular parasite invasion strategies. *Science*. **304:** 248-253.

57. Upton, S. J. (1997) *In vitro* cultivation. En: Cryptosporidiosis of Humans and Animals (Fayer, R., ed.), págs. 181-207. Florida, USA: CRC Press.

58. Arrowood, M. J. (2002) *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clinical Microbiology Review*. **15:** 390-400.

59. Hijjawi, N. S. (2003) *In vitro* cultivation and development of *Cryptosporidium* in cell culture. En: *Cryptosporidium form Molecules to Disease* (Thompson, R. C. A., Armosn, A. & Morgan-Ryan, U. M., eds.), págs. 233-253. Amsterdam: Elsevier.

60. Huang, B. Q., Chen, X. M. & LaRusso, N. F. (2004) *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalisation by human biliary epithelia *in vivo*: a morphologic study. *Journal of Parasitology*. **90:** 212-221.

61. Morrissette, N. S. & Sibley, L. D. (2002) Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **66:** 21-38.

62. Hijjawi, N. S., Meloni, B. P., Ng'anzo, M., Ryan, U. M., Olson, M. E., Cox, P. T., Monis, P. T. & Thompson, R. C. A. (2004) Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitoylogy*. **34:** 769-777.

63. Abrahamsen, M. S., Templeton, T. J., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Zhu, G., Lameto, C. A., Deng, M., Liu, C., Wildmer, G., Tzipari, S., Buck, G. A., Xu, P., Bankier, A. T., Dear, P. H., Confortov, B. A., Spriggs, H. F., Iyer, L., Ananthanaman, V., Aravind, L. & Kapur, V. (2004) Complete genome sequence of apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. **302:** 441-445.

64. Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R. H. & Lal, A. A. (2001) Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases*. **185:** 1846-1848.

65. Ong, C. S., Eisler, D. L., Alikhani, A., Fung, V. W., Tomblin, J., Bowie, W. R. & Isaac-Renton, J. L. (2002) Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infection with a cervine genotype. *Emerging Infectious Diseases*. **8:** 263-268.

66. Sulaiman, J. M., Xiao, L., Yang, C., Escalante, L., Moore, A., Beard, C. B., Arrowood, M. J. & Lal, A. A. (1998) Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerging Infectious Diseases*. **4:** 681-688.

67. Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M. J., Shulaw, W., Thompson, R. C., Fayer, R. & Lal, A. A. (1999) Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied Environmental Microbiology*. **65:** 3386-3391.

68. Morgan, U. M., Sargent, K. D., Deplazes, P., Forbes, D. A., Spano, F., Hertzberg, H., Elliot, A. & Thompson, R. C. (1998) Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology*. **117:** 31-37.

69. Gatei, W., Greensill, J., Ashford, R. W., Cuevas, L. E., Perry, C. M., Cunliffe, N. A., Beeching, N. J. & Hart, C. A. (2003) Molecular analysis of the 18S rRNA

gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*. **41:** 1458-1462.

70. Palmer, C. J., Xiao, L., Terashima, A., Guerra, H., Gotuzzo, E., Saldias, G., Bonilla, J. A., Zhou, A., Lindquist, A. & Upton, S. J. (2003) *Cryptosporidium* muris, a rodent pathogen recovered from a human in Peru. *Emerging Infectious Diseases*. **9:** 1174-1176.

71. Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A. A., Montali, R. J., Fayer, R. & Lal, A. A. (1999) Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based o the small-subunit rRNA gene locus. *Applied Environmental Microbiology*. **65:** 1578-1583.

72. Sulaiman, I. M., Morgan. U. M., Thompson, R. C., Lal, A. A. & Xiao, L. (2000) Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied Environmental Microbiology*. **66:** 2385-2391.

73. Spano, F., Putignani, L., Crisanti, A., Sallicandro, P., Morgan, U. M., Le Blancq, S. M., Tehack, L., Tzipori, S. & Widmer, G. (1998) Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. *Journal of Clinical Microbiology*. **36:** 3255-3259.

74. Mallon, M. E., MacLeod, A., Wastling, J. M., Simth, H. & Tait, A. (2003) Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and substructuring. *Infection Genetics and Evolution*. **3:** 207-218.

75. Marshall, A. T. & LaMont, J. T. (1997) Criptosporidiosis and public health. *Hospital Practitioner (Off. Ed.)*. **32:** 15-16.

76. Molbak, K., Andersen, M., Aaby, P., Hojlyng, N., Jakobsen, M., Sodemann, M. & da Silva, A. P. (1997) *Cryptosporidium* infection in infancy as a cause of malnutrition: a community study from Guinea-Bissau, West Africa. *American Journal of Clinical Nutrition*. **65:** 149-152.

77. Farthing, M. J. (2000) Clinical aspects of human cryptosporidiosis. *Contributions to Microbiology*. **6:** 50-74.

78. Tzipori, S. & Ward, H. (2002) Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*. **4:** 1047-1058.

79. Peng, M. M., Xiao, L., Freeman, A. R., Arrowood, M. J., Escalante, A. A., Weltman, A. C., Ong, C. S., MacKenzie, W. R., Lal, A. A. & Beard, C. B. (1997) Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases*. **3:** 567-573.

80. McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Díaz, S. & Nichols, G. L. (2000) Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp in 1705 fecal simples from hu-

mans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology*. **38:** 3984-3990.

81. Xiao, L., Morgan, U. M., Fayer, R., Thompson, R. C. & Lal, A. A. (2000) *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitology Today*. **16:** 287-292.

82. Santin, M., Trout, J. M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E. & Fayer, R. (2004) Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*. **122:** 103-1117.

83. Becher, K. A., Robertson, I. D., Fraser, D. M., Palmer, D. G. & Thompson, R. C. A. (2004) Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Veterinary Parasitology*. **123:** 1-9.

84. Huang, K. & Yang, S. (2002) Inhibitory effect of selenium on *Cryptosporidium parvum* infection *in vitro* and *in vivo*. *Biological Trace Elemental Research*. **90:** 261-272.

85. Sischo, W. M., Atwill, E. R., Lanyon, L. E. & George, J. (2000) Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the north eastern United States. *Preventive Veterinary Medicine*. **43:** 253-267.

86. Heitman, T. L., Frederick, L. M., Viste, J. R., Gusselle, N. J., Morgan, U. M., Thompson, R. C. & Olson, M. E. (2002) Prevalence of *Giarda* and *Cryptosporidium* spp. isolates from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatuhewan River Basin in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Microbiology*. **48:** 530-541.

87. Harper, C. M., Cowell, N. A., Adams, B. C., Langley, A. J. & Wohlsen, T. D. (2002) Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. *Communicable Diseases Intell*. **26:** 449-450. (Citado por Ramírez *et al.,* (55)).

88. Gelletlie, R., Stuart, J., Soltanpoor, N., Armstrong, R. & Nichols, G. (1997) Cryptosporidiosis associated with school milk. *Lancet*. **350:** 1005-1006.

89. Chalmers, R. M., Elwin, K., Reilly, W. J., Irvine, H., Thomas, A. L. & Hunter, P. R. (2002) *Cryptosporidium* in farmed animals: the detection of a novel isolate in sheep. *International Journal for Parasitology*. **32:** 21-26.

90. de Graaf, D. C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L. M., Abbassi, H. & Peeters, J. E. (1999) A review of the importante of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*. **29:** 1269-1287.

91. Ortega-Mora, L. M. & Wright, S. E. (1994) Age-related resistance in ovine cryptosporidiosis patterns of infection and humoral immune response. *Infection and Immunity*. **62:** 5003-5009.

92. Pereira, S. J., Ramírez, N. E., Xiao, L. & Ward, L. A. (2002) Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *Jounal of Infectious Diseases*. **3:** 567-573.

93. Ryan, U. M., Monis, P., Enemark, H. L., Sulaoman, I., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, R., Robertson, J., Lal, A. A., Thompson, R. C. A. & Xiao, L. (2004) *Cryptosporidium suis* sp (Apicomplexa; Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*. **90:** 769-773.

94. Giselle, N. J., Appalbee, A. J. & Olson, M. E. (2003) Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs from weaning to market. *Veterinary Parasitology*. **113:** 7-18.

95. Tacal Jr., J. V., Sobieh, M. & el-Ahraf, A. (1987) *Cryptosporidium* in market pig in southern California, USA. *Veterinary Record*. **120:** 615-616.

96. Olson, M. E.; Thorlakson, C. L., Deselliers, L., Morck, D. W. & McAlister, T. A. (1997) *Giardia* and *Crytposporidium* in Canadian farm animals. *Veterinary Parasitology*. **68:** 375-381.

97. Kaminjolo, J. S., Adesiyum, A. A., Loregnard, R. & Kitson-Piggott, W. (1993) Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in livestock in Trinidad and Tobago. *Veterinary Parasitology*. **45:** 209-213.

98. Quilez, J., Sánchez-Acedo, C., Clavel, A., del Cacho, E. & López-Bernal, F. (1996) Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Veterniary Parasitology*. **67:** 83-88.

99. Sturdee, A. P., Bodley-Tickell, A. T., Archer, A. & Chalmers, R. M. (2003) Longtern study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*. **116:** 97-113.

100. Majewska, A. C., Werner, A., Sulima, P. & Luti, T. (1999) Survey of equine cryptosporidiosis in Poland and the possibility of zoonotic transmission. *Annals of Agriculture and Enviromental Medicine*. **6:** 161-165.

101. Coleman, S. U., Klei, T. R., French, D. D., Chapman, M. R. & Corstvet, R. E. (1889) Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in equids in Louisiana. *American Journal of Veterinary Research*. **50:** 575-577.

102. Xiao, L. & Herd, R. P. (1994) Epidemiology of equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. *Equine Veterinary Journal*. **26:** 14-17.

103. Xiao, L. & Herd, R. P. (1994) Review of equine *Cryptosporidium* infection. *Equine Veterinary Journal*. **26:** 9-13.

104. Grinberg, A., Oliver, L., Learmonth, J. J., Leyland, M., Roe, W. & Ponroy, W. E. (2003) Identification of *Cryptosporidium parvum* "cattle" genotype from a severe outbreak of neonatal foal diarrhoea. *Veterinary Record*. **153:** 628-631.

105. Streter, T. & Varga, I. (2000) Cryptosporidiosis in birds-a review. *Veterinary Parasitology*. **87:** 261-279.

106. Akiyoshi, D. E., Mor, S. & Tzipori, S. (2003) Rapid displacement of *Cryptosporidium parvum* type 1 by type 2 in mixed infections in piglets. *Infection and Immunity*. **71:** 5765-5771.

107. Chalmers, R. M., Sturdee, A. P., Bull, S. A., Miller, A. & Wright, S. E. (1997) The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitological Research*. **83:** 472-482.

108. Perz, J. F. & Le Blanncq, S. M. (2001) Cryptosporidium parvum infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. *Applied Enviromental Microbiology*. **67:** 1154-1162.

109. Atwill, E. P., Sweitzer, R. A., Pereira, M. G., Gardner, I. A., Van Vuren, D. & Boyce, W. M. (1997) Prevalence of and associated risk factors for sheding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. *Applied Environmental Microbiology*. **63:** 3946-3949.

110. Ryan, M. J., Sundberg, J. P., Sanerschell, R. J. & Todd Jr., K. S. (1986) *Cryptosporidium* in a wild cottontail rabbit (*Sylvaticus floridanus*). *Journal of Wildlife Diseases*. **22:** 267-271.

111. Sundberg, J. P., Hill, D. & Ryan, M. J. (1982) Cryptosporidiosis in a gray squired. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **181:** 1420-1422.

112. Olson, M. E., O´Handley, R. M., Ralston, B. J., McAllister, T. A. & Thompson, R. C. A. (2004a) Update on Cryptosporidiosis in cattle. *Trends in Parasitology*. **20:** 185-191.

113. Olson, M. E., Ralston, B. J., O´Handley, R. M., Guselle, N. J. & Appelbee, A. J. (2004b) What is the clinical and zoonotic significance of cryptosporidiosis in domestic animals and Wildlife. En *Cryptosporidium: from Molecules to Disease* (Thompson, R. C. A. ed.). pp. 51-68. Elsevier. Amsterdam.

114. Navin, T. R. & Juranek, D. D. (1984) *Cryptosporidiosis*: Clinical epidemiologic and parasitologic review. *Review of Infectious Diseases*. **6:** 313-327.

115. Anderson, B. C. (1991) Prevalence of *Cryptosporidium muris*-like oocysts among cattle populations of the United States: preliminary report. *Journal of Protozoology*. **28:** 145-155.

116. Irwin, P. J. (2002) Companion animal parasitology: a clinical perspective. *International Journal of Parasitology*. **32:** 581-593.

117. Hill, S. L., Cheney, J. M., Taton-Allen, G. F., Reiff, J. S., Bruns, C. & Lappin, M. R. (2000) Prevalence of enteric zoonotic organisms in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* **216:** 687-692.

118. Meisel, J. L., Perera, P. R., Meligro, C. & Rubin, C. E. (1976) Overwhelming watery diarrea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*. **70:** 1156-1160.

119. Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, I. & Gilman, A. A. (2001) Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases*. **183:** 492-497.

120. Brownstein, D. G., Strandberg, J. D., Montali, R. J., Bush, M. & Fortner, J. (1997) *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. *Veterinary Pathology*. **14:** 6060-617.

121. Pedraza-Díaz, S., Amar, C., Iversen, A. M., Stanley, P. J. & McLauchlin, J. (2001) Unusual *Cryptosporidium* sp. recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* "dog type" from patients in England. *Journal of Medical Microbiology*. **50:** 293-296.

122. Upton, S. J., McAllister, C. J., Freed, P. S. & Barnard, S. M. (1989) *Cryptosporidium* spp. in wild and captive reptiles. *Journal of Wildlife Diseases*. **25:** 20-30.

123. Landsberg, J. H. & Paperna, I. (1986) Ultrastructural-study of the ooccidian *Cryptosporidium* sp. from stomachs of juvenile cichlid fish. *Diseases of Aquatic Organisms*. **2:** 13-20.

124. Muench, T. R. & White, M. R. (1997) Cryptosporidiosis in a tropical fresh water catfish (*Plecostomum* spp.). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **9:** 87-90.

125. Alvarez-Pellitero, P. & Sitja-Bobadilla, A. (2002) *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*. **32:** 1007-1021.

126. Fayer, R., Lewis, E. J., Trout, J. M., Graczyk, T. K., Jenkins, M. C., Higgins, L., Xiao, L. & Lal, A. A. (1999) *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. *Emerging Infectious Diseases*. **5:** 706-710.

127. Graczyk, T. K., Fayer, R., Cranfield, M. R. & Conn, D. B. (1999) Recovery of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clams (*Corbicula flumirala*). *Applied Environmental Microbiology*. **64:** 427-430.

128. Fayer, R., Farley, A. A., Earl, E. J., Trout, J. M. & Graczyk, T. K. (1997) Potential role of the Eastern oyster *Cassostrea virginica*, in the epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. *Applied Environmental Microbiology*. **63:** 2086-2088.

129. Garcia, L. S., Bruckner, D. A., Brewer, T. C. & Shimizu, R. Y. (1983) Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. **18:** 185-190.

130. Nielsen, C. K. & Ward, L. A. (1999) Enhanced defection of *Cryptosporidium parvum* in the acid-fast stain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **11:** 567-569.

131. Garcia, L. S. & Shimizu, R. Y. (1997) Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. **35:** 1526-1529.

132. Chan, R., Chen, J., York, M. K., Setijono, N., Kaplan, R. L., Graham, F. & Tanowitz, H. B. (2000) Evaluation of a combination rapid immunoassay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. **38:** 393-394.

133. Sharp, S. E., Suarez, C. A., Duran, Y. & Pappiti, R. J. (2001) Evaluation of the triage microparasite panel for detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, and *Crytposporidium parvum* in patient stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. **39:** 332-334.

134. Carey, C. M., Lee, H. & Trevors, J. T. (2004) Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*. **38:** 818-862.

135. Sulaiman, I. M., Xiao, L. & Lal, A. A. (1999) Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Applied Enviromental Microbiology*. **65:** 4431-4435.

136. Sterling, C. S. (2000) Cryptosporidiosis: the treatment dilemma. *Journal of Medical Microbiology*. **49:** 2007-2008.

137. Rossignol, J. F., Hidalgo, H., Feregrino, M., Higuera, F., Gomez, W. H., Romero, J. L., Padierna, J., Geyne, A. & Ayers, M. S. (1998) A "double-blind" placebo-controlled study of mitazoxanida in the treatment of cryptosporidial diarrea in AIDS patients in Mexico. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*. **92:** 663-666.

138. Rossignol, J. F., Ayoub, A. & Ayers, M. S. (2001) Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized double-blind placebo-controlled study of nitazoanida. *Journal of Infectious Diseases*. **184:** 103-106.

139. Gilles, H. M. & Hoffman, P. S. (2002) Treatment of intestinal parasitic infections: a review of mitazoxanida. *Trends in Parasitology*. **18:** 95-97.

140. Mele, R., Gomez, M. a., Tosini, F. & Pozio, E. (2003) Indinavir reduces *Cryptosporidium parvum* infection in both *in vitro* and *in vivo* models. *International Journal for Parasitology*. **33:** 757-7674.

141. Blagburn, B. L., Drain, K. L., Land, T. M., Kimard, R. G., Moore, P. H., Lindsey, O. S., Patrick, D. A., Boykin, D. W. & Tidwell, R. R. (1998) Comparative efficacy evaluation of dicationic carbazole compounds, nitazoxanida, and paromomycin against *Cryptosporidium parvum* infections in a neonatal mouse model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **42:** 2877-2882.

142. Gobel, E. & Loscher, T. (1987) Possibilities of treating cryptosporidiosis in calves, in man and animals. *Tropical Medicine and Parasitology*. **38:** 253-254.

143. Moon, H. W., Woode, G. N. & Ahrens, F. A. (1982) Attempted chemoprophylasis of criptoporidiosis in calves. *Veterinary Record*. **110:** 181.

144. Fahey, T. (2003) Cryptosporidiosis Prim. *Cave Update Ob/Gyns*. **2:** 75-80.

145. Castro-Ermida, J. A., Quilez-Cinca, J., López-Bernard, F., Sánchez-Acedo, C., Freire-Santos, F. & Ares-Mazas, E. (2001) Treatment with β-cyclodextrin of natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs under field conditions. *International Journal for Parasitology*. **31:** 1134-1137.

146. Fayer, R., Andrews, C., Ungar, B. L. P. & Blagburn, B. (1989) Efficacy of hyperimmune bovine calostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. *Journal of Parasitology*. **75:** 393-397.

147. Viu, M., Quilez, J., Sánchez-Acedo, C., Del Cacho, E. & López-Bernard, F. (2002) Field trial on the therapeutic efficacy of paromomycin on natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. *Veterinary Parasitology*. **90:** 163-170.

148. Mancassola, R., Reperant, J. M., Naciri, M. & Chartier, C. (1993) Chemoprophylaxis of *Cryptosporidium parvum* infection with paromomycin in kids and immunological study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **39:** 75-78.

149. Uip, D. E., Lima, A. L., Amato, V., Bonlos, M., Neto, V. A. & Bem, D. D. (1998) Roxithromycin treatment for diarrhoea caused by *Cryptosporidium* spp in patientes with AIDS. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 41, *Supplement* **B:** 93-97.

150. Joaquim, A. (2003) Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Veterinary Parasitology*. **112:** 277-288.

151. Vilacorta, J., Peeters, J. E., Vanodenbosch, E., Ares-Mazas, E. & Theys, H. (1991) Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in calves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **35:** 283-287.

152. Holley, H. P. & Dover, C. (1986) *Cryptosporidium*: A common cause of parasitic diarrhea in other wise healthy individuals. *Journal of Infectious Diseases*. **153:** 365-368.

153. Alak, J. I., Wolf, B. W., Mdurvwa, E. G., Pimentel-Smith, G. E., Kolavola, S., Abderahman, H. & Suppiramanian, V. (1999) Supplementation with *Lactobacillus reuteri* or *L. acidophilus* reduced intestinal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in immunodeficient C57Bl/6 mice. *Cellular and Molecular Biology*. **45:** 855-863.

154. Mancassola, L., Richard, A. & Naciri, M. (1997) Evaluation of decoquinate to treat experimental cryptosporidiosis in kids. *Veterinary Parasitology*. **69:** 31-37.

155. Morrison, L. (1998) Cryptosporidiosis in a Critical Review of the Treatment and Prophylaxis of AIDS-related Opportunistic Infections. New York: TAG. http://www.aidsinfonyc.org/tag/comp/ois98/14.html.

156. Tzipori, S., Robertson, D. & Cooper, D. (1987) Cronic cryptosporidial diarrhoea and hyperimmune cow colostrum. *Lancet II*. **2 (8554):** 344-345.

157. Nord, J., Ma, P., Di John, D., Tzipori, S., Sahner, D. & Shieb, G. (1990) Treatment with bovine hyperimmune colostrum of cryptosporidial diarrhoea in AIDS patients. *AIDS*. **4:** 581-584.

158. Harp, J. A., Woodmansee, D. B. & Moon, H. W. (1989) Effect of colostral antibody on susceptibility of calves to *Cryptosporidium parvum* infection. *American Journal Research*. **50:** 2117-2119.

159. Fayer, R., Andrews, C., Unger, B. P. L. & Blagburn, B. (1989) Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of criptosporidiosis in neonatal calves. *Journal of Parasitology*. **79:** 771-774.

160. Riggs, M. W., Schaefer, D. A., Kapil, S. J., Barley-Maloney, L. & Peryman, L. E. (2002) Efficacy of monoclonal antibodies against defined antigens for passive immunotherapy of chronic gastrointestinal cryptosporidiosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **46:** 275-282.

161. Okhuysen, P. C., Chappel, C. L., Crabb, J., Valdez, L. M., Douglas, E. T. & DuPont, H. L. (1998) Prophylactic effect of bovine anti-*Cryptosporidium* hyperimmune colostrum immuno globulin in healthy volunteers challenged with *Cryptosporidium parvum*. *Clinical Infectious Diseases*. **26:** 1324-1329.

162. Alak, J. I., Wolf, B. W., Mdurvwa, E. G., Pimentel-Smith, G. E. & Adeyeneo, O. (1997) Effect of *Lactobacillus reuteri* on intestinl resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in a murine model of acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Infectious Diseases*. **175:** 218-221.

163. Dann, S. M., Okhuysen, P. C., Salameh, B. M., DuPont, D. L. & Chappell, C. L. (2000) Fecal antibodies to *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *Infection and Immunity*. **68:** 5068-5074.

164. Foster, J. C., Glass, M. D., Courtney, P. D. & Ward, L. A. (2003) Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Food Microbiology*. **20:** 351-357.

165. de Graaf, D. C., Spano, F., Petry, F., Sagodira, S. & Bonnin, A. (1999) Speculation on whether a vaccine against cryptosporidiosis is a reality or fantasy. *International Journal for Parasitology*. **29:** 1289-1306.

166. Riggs, M. W. (2002) Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes and Infection*. **4:** 1067-1080.

167. Dann, S. M., Okhuysen, P. C., Salameh, B. M., DuPont, D. L. & Chappell, C. L. (2000) Fecal antibodies to *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *Infection and Immunity*. **68:** 5068-5074.

168. Hunt, E., Fu, Q., Armstrong, M. U., Rennix, D. K., Webster, D. W., Galanko, J. A., Chen, W., Weaver, E. M., Argenzio, R. A. & Rhoads, J. M. (2002) Oral bovine serum concentrate improves cryptosporidial enteritis in calves. *Pediatric Research*. **51:** 370-376.

169. Smerdon, W. J., Nichols, T., Chalmers, R. M., Heine, H. & Reacher, M. H. (2003) Foot and mouth disease in livestock and reduced cyptosporidiosis in humans, England and Wales. *Emerging Infectious Diseases*. **9:** 22-23.

170. Hunter, P. R., Chalmers, R. M., Syed, Q., Hughes, L. S., Woodhouse, S. & Swift, L. (2003) Foot and mouth disease and cryptosporidiosis: possible interaction between emerging infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*. **9:** 109-112.

PARTE II. TOXOPLASMOSIS

II.1. INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria producida por un protozoo intracelular de los *Apicomplexa* denominado *Toxoplasma gondii*. Se trata de un parásito muy ubicuo que se extiende por todo el mundo y que afecta a la especie humana y a la mayoría de las especies animales homeotermas.

En EE.UU y R.U. entre el 20 y el 40% de su población adulta presenta anticuerpos contra *T. gondii*; en Europa continental y Suramérica se ha encontrado en el 50-80% de los adultos (1). Las pérdidas socioeconómicas de la toxoplasmosis congénita humana son enormes; Roberts y Frenkel (2) calcularon que sólo en EE.UU. las pérdidas de 1993 por inasistencia al trabajo, gastos hospitalarios y residenciales, tratamientos médicos, etc., llegaron a 5.3 millones de dólares.

En la mayoría de las personas y de los animales adultos en buen estado de salud, esto es, inmunocompetentes, la infección toxoplásmica es inaparente, pero ocasionalemente origina graves afecciones. Así sucede con la toxoplasmosis fetal de transmisión transplacentaria, incluso cuando las madres responsables del contagio son asintomáticas. Otro tanto acaece con la encefalitis toxoplásmica de los enfermos de SIDA y de otros enfermos inmunodeficientes, como se verá más adelante.

En los animales de abasto (rumiantes, cerdos) y en los équidos, la toxoplasmosis es una causa importante de abortos sobre todo en las ovejas. Los osos de EE.UU. y Canadá, cuya carne suelen ingerir sus cazadores, familiares y amigos, están frecuentemente parasitados con *T. gondii*, lo mismo que las aves de granja y muchas silvestres. Por tanto, también es una parasitosis de gran importancia económica para la ganadería.

Los gatos domésticos y los félidos salvajes son los únicos hospedadores definitivos de *T. gondii* y consecuentemente, las únicas fuentes primarias del parásito.

II.2. HISTORIA

El agente etiológico de la toxoplasmosis lo describieron por primera vez, hace un siglo, Nicolle y Manceaux (3-5) en tres memorias que presentaron en la Academia de Ciencias francesa para ser discutidas en sus sesiones científicas. De hecho, estos investigadores fueron muy afortunados al descubrirlo en un gondi (*Ctenodactylus gondi*) del animalario del Instituto Pasteur de Túnez, pues este animal, en condiciones naturales, habita en las regiones desérticas norteafricanas, biotopo cuyas condiciones climáticas son bastante desfavorables para el desarrollo del parásito, por lo que este roedor en muy raras ocasiones está parasitado por *Toxoplasma*.

Cuando con el paso del tiempo se identificaron muchas más especies animales parasitadas, los toxoplasmas responsables se designaron inicialmente con las denominaciones linneanas de estas mismas especies. No obstante, como el agente causal era la misma y única especie que parasitaba al gondi, aplicando las normas de Linneo y de acuerdo con la ley de prioridad del descubrimiento, hubo de llamarse *Toxoplasma gondii*.

Como escribe Euzèby (10), Cowen y Paige fueron los primeros en 1939 en comprobar en un niño fallecido de encefalitis, que el agente responsable era *Toxoplasma gondii*. Inoculando, por vía intraperitoneal, ratones y conejos con homogeneizados cerebrales del niño fallecido descubrieron, pasadas 4-5 semanas, que los tejidos de los animales inoculados presentaban quistes del parásito.

Transcurridos algunos años se vio que, además de la humana y de las especies animales citadas, otras muchas servían de hospedadores de *T. gondii*. Durante mucho tiempo la naturaleza y biología del parásito atrajeron poco la atención, pero en 1970 Hutchison *et al*. (6) y Frenkel *et al*. (7) publicaron, independientemente, que *T. gondii* era un coccidio, cuyo ciclo biológico se completaba entre el gato (hospedador definitivo) y una serie de mamíferos y aves (hospedadores intermediarios) en los que el parásito produce unos quistes con bradizoitos que son infectantes para el gato (6, 7).

II.3. BIOLOGÍA DE *TOXOPLAMA GONDII*

Hasta 1970 los parasitólogos tuvieron muchas dificultades para situar este protozoo en el lugar que le correspondía, dado el gran parecido de sus merozoitos con los del género *Eimeria*; fue en la década citada, cuando se descubrió simultáneamente en varios países (6, 7, 10) que en el gato *T. gondii* producía quis-

Tabla II.1. *Diferencias entre algunos géneros de coocidios.*

Caracterísitca	**Eimeria**	**Isospora**	**Toxoplasma**	**Sarcocystis**	**Besnoitia**
Endodiogenia	-	-	+	+	+
Merogonia	+	+	+	-	+
Predominio intestinal (I) o parenteral (P)	I*	I	P	P	P
Esporulación intestinal en mamíferos	-	-	-	+	-
Normalmente reproducción asexual autolimitada	+	+	-	-	-
Merontes con taquizoitos	-	+	+	?	+
Merontes bradizoitos	?	?	+	+	+
Heteroxenos**	-	-	+	+	+
Vector	-	-	Vertebrado	Vertebrado	Vertebrado
Homoxenos	+	+	+	?	+
Estenoxeno (Es) o Eurixeno (Eu)	Es	Es	Eu	Es	Eu
Contagio transplacentario	-	-	+	-	-
Metrocitos	-	-	-	+	±
Ciclo de dos hospedadores ausente (A), obligatorio (O) o facultativo (F)	A	F	F	O	F
Merontes visibles a simple vista	±	-	-	+	+
Merontes tabicados	-	-	-	+	-
Núcleos en capa interna de la pared del meronte	-	-	-	-	+

En el texto se hace un breve comentario de esta tabla.
* Salvo *E. stiedai* (del hígado del conejo) y *E. truncata* (de los riñones de gatos).
** Excepto en laboratorio bajo condiciones anormales.
Fuente: Levine, N. D. (Referencia 11).

tes indistinguibles de los que entonces se llamaban *oocistos de raza pequeña de Isospora bigemina*, es decir, que cada uno de ellos contenía dos esporoquistes con cuatro esporozoitos. En la Tabla II.1 se muestran las diferencias de algunos géneros de coccidios. Como puede apreciarse, la endodiogenia es propia de *Toxoplasma* y no de los dos coccidios clásicos (*Eimeria* e *Isospora*). La merogonia en las células intestinales tiene lugar en los tres géneros, si bien es la forma predominante en *Eimeria* e *Isospora*, mientras que en *Toxoplasma* la que sobresale es la parenteral.

Frenkel (7) ha definido los taquizoitos como formas de multiplicación rápida (característica de la infección aguda), en cambio considera a los bradizoitos como formas enquistadas, de multiplicación lenta y propios de las infecciones crónicas.

Toxoplama es heteroxeno (y a veces homoxeno), encontrándose en los tejidos de un hospedador y en el intestino de otro (y en ocasiones en los tejidos y el intestino del mismo animal). *Eimeria* e *Isospora* son homoxenos y solo se encuentran en el intestino. Además, *Toxoplasma* es eurixeno y parasita a una gran cantidad de hospedadores (más de 300 especies homeotermas), en cambio *Eimeria* e *Isospora* son generalmente estenoxenos. Por último, *Toxoplasma* se transmite por vía transplacentaria, algo que no hacen ni *Eimeria* ni *Isospora*.

Como se dice más atrás, la mayoría de las toxoplasmosis son inaparentes, pero las de los animales neonatos pueden acarrearles la muerte; *T. gondii* tiene un gran interés económico en la ganadería ovina por las graves pérdidas que suponen los abortos y las muertes de corderos recién nacidos.

Mención especial merece la toxoplasmosis congénita humana que se presenta en el 0,25 al 7 por mil de los neonatos de diversos países. De ellos, el 5-15% mueren al nacimiento, un 8-10% padecen graves lesiones cerebrales y oculares, del 10 al 13% sufren alteraciones visuales severas y el 58 al 72% son clínicamente normales, si bien en su infancia y juventud pueden estar afectados de coriorretinitis (8, 9).

II.3.1. Estructuras, organelas y quistes

Los merozoitos de *T. gondii* tienen una forma curvada, que recuerda la de un plátano, con uno de sus extremos agudo (el apical) y el otro (el basal) redondeado y más ancho. Miden de 4-8 μm de longitud por 2-4 μm de anchura. Presentan todas las estructuras y organelas de los *Apicomplexa* (véase Figura II.1),

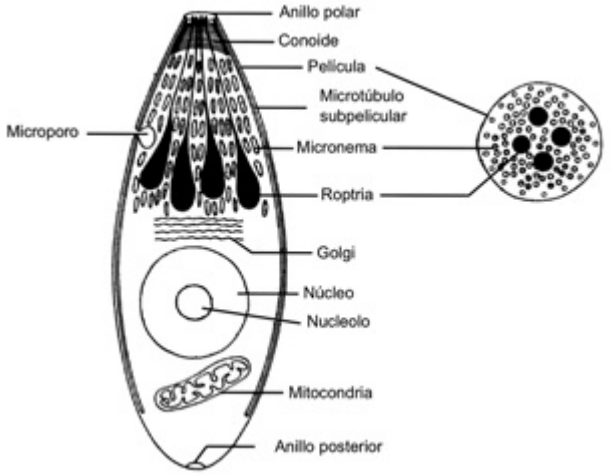


Figura II.1. *Estructuras de los protozoos Apicomplexa (De Levine, referencia 11).*

como complejo apical con 22-30 microtúbulos, no más de 50 micronemas y entre 5 y 20-24 roptrias. Parasitan la gran mayoría de los tejidos corporales, pero tienen predilección por el sistema nervioso y muscular estriado (cardiaco y esquelético) y por las membranas fetales (10).

En las infecciones agudas *T. gondii* puede hallarse libre en la sangre y el exudado peritoneal; también en estas infecciones se encuentran grupos de merozoitos (taquizoitos) en las células tisulares, son los que se conocían hace más de siete lustros como "pseudoquistes", nombre que ha quedado obsoleto y ya no se usa (11).

En las infecciones crónicas hay quistes que contienen bradizoitos; se sitúan en los tejidos parenterales y sobre todo, en el encéfalo. En el epitelio intestinal y a partir de bradizoitos se originan gamontes que dan lugar a macrogametos y microgametos que fertilizándose por fusión forman zigotos de los que proceden los ooquistes que se eliminan con las heces (11). Los ooquistes son inicialmente esféricos, pero después de su esporulación en el medio ambiente (2-3 días a 25-40 ºC y humedad del 75-80%) aumentan de tamaño y adquieren forma ovoide alcanzando una longitud de 11-14 µm y una anchura de 9-11 µm. Los ooquistes solo se originan en los enterocitos de los félidos (incluido el gato), mientras que los ooquistes tisulares o parenterales se producen en los tejidos de los animales hospedadores intermediarios, en una gran variedad de especies homeotermas (10).

II.3.2. Biología poblacional de Toxoplasma

Toxoplasma es un agente infectivo casi ubicuo, con un número enorme de hospedadores y cuyo ciclo sexual está bien descrito pero todavía guarda secretos en lo que concierne a su biología poblacional. De hecho, son muy pocas las estirpes o cepas que dominan nichos muy amplios (12); por ejemplo, en Europa y América del Norte la mayoría de los aislamientos humanos y de animales domésticos y de renta pertenecen a tres tipos clónicos, I, II y III (13). Sorprende que estas tres estirpes sean en realidad cruces entre el tipo II y una u otra de las dos estirpes, conocidas también como α y β (14). Estos tres genotipos han cruzado dos continentes y tienen, por tanto, una gran ventaja sobre otras estirpes con las que coexisten, aunque no a la misma escala (15). Como señala el profesor Boothroyd en su magnífica y reciente revisión (16), algunos de los genes que podrían ser responsables de estas ventajas comienzan a conocerse ahora.

En otras regiones del mundo y en ciertos nichos de Europa y Norteamérica (p. ej., nutrias marinas de California) no predomina ninguno de los tipos I, II y III citados, si bien muchas estirpes tienen entre sus ancestros algún miembro de estos tres grandes tipos (17). De donde menos información se posee es de África, pero hay datos que indican que América del Sur podría haber sido el lugar de nacimiento de *Toxoplasma*: posee la mayor diversidad de especies de todas las grandes regiones del mundo estudiadas y la mayor diversidad ecológica, lo que podría ser la fuerza que dio lugar y ha mantenido esta diversidad (17).

II.3.3. Caracteres morfológicos

T. gondii se encuentra en los hospedadores intermediarios bajo dos formas distintas, aislado y agrupado. Las formas aisladas son siempre extracelulares, sirvan de ejemplo los taquizoitos que se multiplican activamente en sus células hospedadoras hasta que alcanzan la madurez, momento en el que las destruyen y por tanto, quedan libres (10).

Los quistes, de un diámetro de 60-100 μm, son de pared muy fina formada por dos capas, una originada por la célula hospedadora y otra por el parásito; la formación de la pared se relaciona con el proceso de evasión inmunitaria del parásito (10). Los quistes contienen centenares o millones de bradizoitos (cistozoitos), de morfología similar a los taquizoitos pero más cortos y delgados y con núcleo excéntrico y reducido a una delgada banda marginal; carecen de gránulos de reserva pero poseen proteínas de choque térmico.

Como se indica más adelante, entre las formas de la fase aguda de la infección (taquizoitos) y las de la fase crónica (bradizoitos enquistados) hay grandes diferencias antigénicas y lo que es más importante para el desarrollo de nuevos fármacos, las diferencias también son manifiestas en sus metabolitos, destacando a este respecto, que los bradizoitos producen amilopectina (18). En estudios de expresión génica se han identificado diversas isoformas de varias enzimas tipificadas con la enolasa (19) y la lactato deshidrogenada (20); cada una de ellas tiene especificidad y forma distinta en taquizoitos y bradizoitos (21).

Todavía se desconoce si estas distintas formas dirigen el metabolismo en sentidos diferentes o si simplemente actúan, con más eficacia en un medio intracelular distinto.

Ya se ha dicho que los quistes se forman en todos los tejidos pero preferentemente en el músculo esquelético y en el encéfalo. La presencia de quistes en este órgano desencadena una reacción inflamatoria con engrosamiento del endotelio de los capilares que lo rodean y con la llegada de linfocitos y células de microglía que actúan como macrófagos (22). Los quistes liberan, como se sabe, antígenos solubles con actividad inmunógena (23).

La transición de taquizoitos a quistes se ha comprobado tanto *in vitro* como *in vivo*, pero es más frecuente *in vivo*. Se debe no sólo a que el hospedador alcanza cierto estado inmune, sino también a sus factores genéticos (10, 24). Se ha encontrado en las ratas que la inhibición del desarrollo de taquizoitos en los macrófagos parasitados se acompaña de una abundante producción de antígenos específicos de los bradizoitos. En la reducción del desarrollo o multiplicación de los taquizoitos también influye el NO, dado que su actividad está ligada a la inhibición de las mitocondrias que participan activamente en la proliferación de taquizoitos (25).

La cantidad de taquizoitos que puede obtenerse de un hospedador infectado es muy limitada, lo que dificulta su estudio, sin embargo, Soete *et al*. (26) mejoraron esta situación al descubrir algunos estímulos que inducían la diferenciación *in vitro*. Desde que publicaron que las condiciones alcalinas favorecían la diferenciación, hasta ahora, se han encontrado otros agentes estresantes que inducen el desarrollo de bradizoitos, lo que sugiere la implicación de algún iniciador relativamente inespecífico. Se ha sugerido (27) que hasta el estrés de la respuesta inmune desencadenada por los taquizoitos (por ejemplo, generación de NO) podría ser suficiente, pero es difícil saber si el óxido es el inductor biológico *in vivo*.

Los quistes son formas de resistencia tisulares y en la mayoría de los animales se forman en la primera semana después de la infección. En ratones in-

fectados, *per os* experimentalmente con quistes de *T. gondii* se encuentran taquizoitos desde el sexto día después de su ingestión y bradizoitos después del noveno día. Sin embargo, para obtener quistes tisulares es mejor inocular los animales por lo menos tres meses antes (10, 16, 24). No todas las cepas o estirpes tienen la misma capacidad de formar quistes; se ha comprobado que la virulencia y la génesis de quistes guardan una relación inversa, las estirpes poco virulentas forman muy pronto quistes en abundancia, en cambio las virulentas apenas los producen.

La reactivación de los quistes en el periodo de cronicidad de la toxoplasmosis se debe a la ruptura de la inmunidad. Los primeros taquizoitos se detectan experimentalmente en los ratones por serología específica (demostración del antígeno SAG1) unos 6 días después del tratamiento inmunosupresor (10). Más adelante se estudian estos aspectos con mayor profundidad.

II.4. GENÓMICA DE *TOXOPLASMA GONDII*

Como muchos otros microorganismos que han sido objeto de profundos estudios, *Toxoplasma* puede manipularse genéticamente. Actualmente se dispone de muchos marcadores selectivos que se usan para su transformación estable y que van de la cloranfenicol-acetil-transferasa (28) a la mucho más versátil, hipoxantin-xantin-guanin-fosforribosil-transferasa (29).

Con su empleo puede manipularse el genoma de *T. gondii* para la deleción de genes y hasta de *clusters* de varios tándemes en una sola operación (30).

Esto ha permitido investigar la función de los genes mediante el análisis de mutantes *knock out* específicos. Igualmente ha posibilitado la introducción de genes en el genoma del parásito y consecuentemente, el desarrollo de métodos para su detección *in vivo* (31), el comprobar la respuesta inmune de ratones transgénicos modelo (32) y el explorar el rol de la variación alela en los genes clave de la virulencia (33). Ha permitido incluso investigar a *T. gondii* como posible vector mochila de vacunas, basándose en su potente respuesta inmunitaria que estimula a otros microorganismos a producir inmunidad frente a los antígenos de otros agentes infecciosos menos manejables o más peligrosos (34).

La combinación del mapeado genético tradicional con la secuenciación física de los cromosomas y la secuenciación genómica a gran escala ha permitido conocer que el genoma nuclear de *Toxoplasma* se compone de 14 de cromo-

somas de unos 2-7 mega-bp (35). Múltiples ensayos han confirmado las primeras investigaciones genéticas que demostraron que las fases asexuales son haploides. Los primeros esfuerzos de secuenciación a gran escala los dirigió el prof. David Sibley de la *Washington University* a partir de taquizoitos, bradizoitos y esporozoitos de diversas especies (21). Después, y con una gran dedicación y esfuerzo en el *Institute for Genomic Research* (TIGR) se logró la secuenciación completa del genoma de las estirpes GT1, ME49 y VEG (que representan respectivamente los tipos I, II y III). Estos trabajos se complementaron con los realizados en el *Wellcome Trust Sanger Centre* con los cromosomas 1A y 1B (los dos cromosomas más pequeños y tan parecidos entre sí en tamaño que se han denominado los A y B) de la cepa RH del tipo I (36).

Debe señalarse que disponiendo de tanta información sobre secuenciación, su utilidad irá paralela con el formato en que sea accesible; afortunadamente este aspecto también se ha beneficiado del gran esfuerzo llevado a cabo por el laboratorio del Dr. David Roos de la *University of Pennsylvania*. Su resultado ha sido ToxoDB (www.ToxoDB.org), un banco de datos intuitivo y fácilmente accesible con abundante información sobre cualquier gen descrito (37). Entre otros datos útiles en esta dirección de Internet están los niveles de expresión de prácticamente todos los genes de diferentes estirpes, los polimorfismos en forma gráfica, la información de espectrometría de masas de los péptidos detectados en diversos trabajos proteómicos, etc. Los datos disponibles en ToxoDB son el resultado del enorme esfuerzo investigador realizado en muchas universidades y centros de investigación.

Los resultados de los primeros trabajos que demostraron que el ciclo sexual acaece en los felinos y que implica la clásica recombinación meiótica se han ampliado mucho con el uso de instrumentos moleculares. Así se ha elaborado un mapa genético de uniones o enlaces (38) y dada la existencia de secuencias completas del genoma de las tres cepas más corrientemente utilizadas y estudiadas, se dispone ahora en todo el genoma de marcadores a nivel de saturación. La creación de microherramientas (*microarrays*) "AHymetrix" para *Toxoplasma*, que comprende, virtualmente, no solo los marcadores de todos los genes conocidos sino también la capacidad de diferenciar muchos de los polimorfismos conocidos, convertirá la elaboración de mapas de la progenie de futuros cruces en un proceso relativamente sencillo. Estas microherramientas (o *chips*) son el resultado del gran esfuerzo bioinformático liderado por los doctores Bayl y Roos, en cuyos laboratorios, de la *University of Pennsylvania* se diseñaron, teniendo en cuenta, además, los resultados de la comunidad científica —cada día más numerosa— que investiga en *Toxoplasma*.

Las estirpes de los tipos I, II y III difieren en muchas propiedades biológicas de gran interés e importancia, no siendo la menor de ellas el curso de las infecciones que causan en los ratones (y posiblemente en otras especies). La base genética de estos fenotipos puede "mapearse" en la progenie F1 de los cruces entre los tipos I x III y II x III que son las dos parejas estudiadas hasta la fecha (39). Usando la estrategia del gen candidato para establecer una suposición razonada sobre qué gen, de un intervalo genético dado, sería el responsable de una diferencia fenotípica particular, se han identificado específicamente dos loci. Ambos son proteínas de roptrias y como se dice más adelante, se admite que las variantes alelas de estas dos proteínas interactúan con un hospedador animal dado, de forma manifiestamente diferente.

Además de los fenotipos biológicamente destacables, y de la gravedad de la enfermedad, para buscar diferencias moleculares de la forma en que la célula hospedadora responde al parásito invasor pueden usarse métodos *in vitro*. La tecnología de las microherramientas ha proporcionado la manera de interrogar al transcriptoma completo de la célula hospedadora para determinar qué genes del hospedador podrían responder diferentemente a distintas cepas de *Toxoplasma* (40-42).

II.5. ENDOCITOSIS

Así se denomina la invasión o penetración de las células hospedadoras, tanto por los esporozoitos y bradizoitos, al iniciarse la infección toxoplasmástica, como por los taquizoitos, cuando el desarrollo de la enfermedad está más avanzado (10).

La invasión de las células hospedadoras por el parásito ha pasado de ser una descripción meramente fenomenológica del proceso, a un concepto molecular mucho más detallado. Y hablando de conceptos moleculares recordemos que desde 1987 se han hecho valiosos descubrimientos en la biología molecular de *T. gondii*. Uno de los más importantes fue el hallazgo en la región apical del parásito de un cuerpo multimembranoso, que recibió varios nombres y entre ellos el de complejo apical o apicomplejo. Es un plástido vestigial con un ancestro común con los plástidos de las algas (43). Por su situación y por estar presente en la mayoría de las especies *Apicomplexa* se ha llamado *apicoplasto*.

Se ha comprobado que las micronemas son organelas secretoras que producen adhesinas fundamentales para la superficie del parásito, destacando MIC 2 (21, 44-47). Esta proteína funciona como un perno que une la actina a la mio-

sina del parásito, moviéndola hacia la superficie y posiblemente también hacia la de la célula hospedadora. Se admite que el C-terminal del dominio citosólico de MIC 2 está unido a la aldosa que sirve de puente para los filamentos cortos de actina que, a su vez, interactúan con una miosina poco corriente que se fija, como una ancla, a la membrana interna del complejo (48). El resultado es un motor molecular que, siempre que pueda fijarse a algo firme del exterior del parásito, lo impulsará hacia delante.

Durante la invasión del hospedador hay una especie de círculo o anillo de contacto entre sus membranas plasmáticas y las del parásito que se conoce como unión o junta móvil (MJ). Las micronemas también contribuyen a la MJ con un componente fundamental, el llamado antígeno membranario apical (AMA 1). La MJ contiene, además, varias proteínas del parásito, de las que algunas no proceden de las micronemas, sino del cuello de las roptrias (su porción más apical). Por esta razón se les conoce como RONs (RO, por roptrias y N por *neck*, cuello en inglés). En resumen, la MJ es el resultado de la colaboración de dos organelas secretoras: micronemas y roptrias (49).

Muchos de los antígenos superficiales, cuya existencia se conocía por marcaje superficial, ya han sido identificados en su mayoría. Casi todos son miembros de una familia de proteínas descrita inicialmente como p30 (50) o SAG1 (acrónimo inglés de *Surface Antigen 1*) (51). Las proteínas de las secuencias relacionadas con SAG1, conocidas por el acrónimo SRS, las codifican unos 100 genes (52). Generalmente solo se expresan en una fase o forma del desarrollo por lo que las superficies antigénicas de los bradizoitos y taquizoitos son muy diferentes. Esto permite a los bradizoitos desarrollar, al mismo tiempo, una respuesta inmune muy potente que elimina a los taquizoitos (53).

Dentro de una fase de desarrollo dada, la abundancia relativa de proteínas SRS varía bastante, siendo algunas mucho más abundantes que otras (54). Esto sugiere que cada proteína tiene muchas funciones diferentes, aunque no se han determinado cuáles son las específicas. Algunas podrían servir de adhesinas en la unión inicial del parásito con la célula hospedadora, mientras otras atraerían la respuesta inmune detrayendo dicha respuesta de otros miembros más importantes (55).

II.6. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Durante la invasión o endocitosis los taquizoitos liberan los contenidos de sus roptrias y gránulos densos; gran parte de este material termina en la célula

hospedadora, asociado a unas estructuras llamadas "evacuolas" (56). Las evacuolas son posiblemente —aunque no se haya demostrado— membranas que limitan estructuras, parecidas a vesículas, que con microscopía electrónica se han observado en el interior de la célula hospedadora, cerca del polo apical del parásito. Se ha comprobado que sus componentes están asociados con la vacuola parasitófora.

Se ha sugerido que una de sus proteínas, la ROP 2, podría estar implicada en la asociación, de las mitocondrias con la membrana de la vacuola parasitófora, observada hace mucho tiempo (57). Aunque en un principio se pensó que esta proteína era transmembranaria integral, resultados más recientes sugieren que se asocia con la membrana por otros medios, puesto que es posible un dominio putativo transmembranario en vez de una α-hélice hidrofóbica anclada (58). ROP 2 es el prototipo de una gran familia de proteínas que se han identificado en estudios proteómicos, genómicos y genéticos. Recientemente se ha demostrado que para la interacción hospedador/parásito son esenciales dos miembros de esta familia.

Los gránulos densos también introducen, de algún modo, sus contenidos en la célula hospedadora, desde donde llegan a millares de destinos, incluída la red interna de la vacuola parasitófora. Estas proteínas poseen frecuentemente una propiedad poco corriente, el pasar de comportarse como proteínas solubles a otro estado asociado fuertemente a las membranas, posiblemente por el impacto de las condiciones locales en la hélice anfipática.

Al menos se ha detectado una proteína de los gránulos densos, GRA7, en la superficie de las células hospedadoras infectadas (59). GRA7 también podría estar implicada en un proceso muy poco corriente de distribución del colesterol por los parásitos (60).

Las roptrias también introducen proteínas solubles en la célula hospedadora. Aunque los científicos lo sopechaban hace tiempo, la evidencia de que las roptrias introducían libremente proteínas solubles en la célula hospedadora, con indepencia de las evacuolas, es relativamente reciente. A este respecto sobresalen dos proteínas que llegan al núcleo de la célula hospedadora: una fosfatasa (PP2c-hn) (61) y una quinasa (ROP 16) (33). Es obviamente predecible que la presencia de estas proteínas ejercerá un gran impacto en la célula infectada. Mientras que esto se ha comprobado para la ROP 16 (que interfiere con las señales de STAT 3 y STAT 6), la función de la fosfatasa PP2c-hn todavía se desconoce. Ambas proteínas son las primeras de lo que se espera sea una larga lista de proteínas solubles inoculadas en la célula hospedadora.

Las proteínas secretadas por las roptrias son muy polimórficas y las diferentes versiones alelas producen respuestas muy distintas en la célula hospedadora. Boothroyd sostiene que las proteínas secretadas por las roptrias son las que más varían de todas las del parásito (16). Cada variante desarrollada en la interfase podría hacerlo literalmente mediante interacciones de proteína/proteína, con una versión especie específica para el hospedador diana. En el ejemplo anterior la nota o el aroma del alelo de la ROP 16 podría haber evolucionado para fosforilar eficientemente la proteína murina, mientras el otro alelo era optimizado como versión aviaria de la misma proteína. Cualquiera que sea la explicación evolutiva de sus diferencias, no hay duda de que sus variantes alelas ejercen un efecto importante en las interrelaciones parásito-hospedador.

Aunque se desconozca su diana, si se introduce un alelo distinto de ROP 18 en una estirpe normalmente covirulenta para los ratones, ocasiona en ésta una virulencia de 4 ciclos logarítmicos mayor para los ratones (62). ROP 18 es otro miembro de la familia ROP 2, pero contrariamente a la ROP 16 soluble, está fuertemente asociada a la membrana de la vacuola parasitaria (63). Se sabe que es una quinasa activa pero se desconoce cómo actúa en la célula hospedadora y cuál es su función última. Su importancia no admite dudas, no solo por sus efectos en la virulencia, sino también por sus acciones en el crecimiento *in vitro* de los parásitos.

En *Toxoplasma* hay muchas rutas bioquímicas que son semejantes a las del mundo vegetal pero que faltan en sus hospedadores mamíferos.

La "metabolómica" de *Toxoplasma* es todavía un proceso en marcha pero muchos trabajos han puesto de manifiesto algunas rutas metabólicas poco usuales. Esto no debe sorprender dados sus tres compartimentos metabólicos distintos (nuclear, mitocondrial y del apicoplasto), con tres ancestros distintos, y una dotación bioquímica que favorece el metabolismo global del parásito, muchas de cuyas rutas son muy diferentes de las de sus hospedadores. Entre las vías menos usuales hay tres que actúan en el apicoplasto, a semejanza de los vegetales:

- Primero, una ferredoxin-NADP(+)-reductasa que reduce la ferredoxina, un mediador redox fundamental para diversas rutas (64).
- Segundo, el ácido lipóico que puede sintetizarse en el plástido o por el contrario, eliminarse de la célula hospedadora (65), lo que contrasta con lo que sucede en muchos eucariotes cuyo lugar de síntesis del ácido son las mitocondrias; y
- Tercero, la biosíntesis de ácidos grasos (tipo II), otra ruta semejante a la de las plantas que también ocurre en el apicoplasto (66). Como señala

Boothroyd (16), de quien proceden muchas de las ideas aquí expuestas, todas estas rutas son excelentes dianas farmacológicas potenciales, ya que son muy diferentes de las rutas de los hospedadores mamíferos. La enorme importancia del plástido es bien evidente por el hecho de constituir la diana de la clindamicina, un fármaco clínicamente eficaz (67).

II.7. INMUNIDAD

Hay muchas rutas que estimulan las vías de respuesta de la inmunidad innata. Entre las primeras células que dan la alarma al organismo por la presencia de agentes extraños y/o patógenos figuran las células dendríticas cuya función es similar a la de los macrófagos. En la toxoplasmosis serían las primeras en producir IL 12, la citoquina clave que inicia la primera respuesta inflamatoria frente a la infección por *T. gondii*.

El sistema inmune innato considera a *Toxoplasma* como un agente a destruir vía diferentes interacciones. Que están implicados los receptores de tipo peaje (*toll-like receptors*, in inglés; TLRs) es evidente por la gran dependencia de MyD88, uno de los receptores de señales más destacado (68). Los fundamentales son TLR2 (69) y TLR9 (70), si bien todavía se desconocen los ligandos del parásito que los estimulan; TLR11 es un receptor poco corriente (propio de los ratones pero infuncional en la especie humana), mas importante para el parásito (71). Debe hacerse constar que reconoce a la profilina ligada a la actina, una proteína bien conservada en su evolución. Puesto que de la profilina sólo sabemos que es una proteína soluble del citosol, ignoramos cómo contacta con un TLR del hospedador, salvo que lo haga por medio de los parásitos a punto de morir, algo difícil de admitir ya que los parásitos en tal trance, posiblemente ya tienen activadas sus respuestas inmunes innatas.

La proteína 70 del choque térmico del parásito (HSP 70) presenta algún reto topológico como estimulante principal del TRL4, dado que a menudo, sus moléculas atraviesan el sistema secretor de las células eucariotas y se pueden detectar en la superficie, donde es posible que continúen, las funciones de sus proteínas carabinas (72). Puede admitirse, así mismo, que la ciclofilina de *Toxoplasma* es un verdadero estimulante del receptor 5 de la quimocina (CCR 5) de las células dendríticas (73), puesto que las ciclofilinas son proteínas pequeñas con capacidad, bien conocida, de interactuar con otras proteínas.

La inducción de la IL 12 lleva, a su vez, al IFN-γ, un mediador clave de la respuesta inmune a *Toxoplama*. Una de las citoquinas fundamentales en esta res-

puesta es el IFN-γ (74). Posiblemente uno de sus mecanismos de acción más raros podría ser la alteración del metabolismo del triptófano del hospedador, cuyo resultado es la inanición del parásito por carencia de este aminoácido esencial (75). Durante la toxoplasmosis las fuentes más importantes de IFN-γ son las células asesinas naturales (NK 1.1^{+}) y los linfocitos T, bajo el estímulo de IL 12 (76, 77).

Durante la respuesta inmune son relativamente pocos los antígenos que sirven de diana: la respuesta inmune de los ratones frente a *Toxoplasma* se dirige inicialmente a muy pocos antígenos. En la respuesta de los linfocitos B son dos los antígenos superficiales inmunodominantes: SAG1 (55) y SAG2, así como varias proteínas de los gránulos densos (78). Estos antígenos también son muy inmunógenos en la especie humana.

Por otra parte se ha visto que el principal antígeno de los linfocitos T es GRA 6, al menos en un modelo murino. Otros investigadores señalan como antígenos fundamentales a GRA 4 y a ROP 7; en la especie humana todavía no se han identificado los antígenos principales de los linfocitos T (16).

El haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es una variable importante del curso de la enfermedad: en experimentos con ratones y personas se ha puesto de manifiesto un importante rol de los genes del MHC en la respuesta del hospedador a la infección por *Toxoplasma*. Su efecto en la especie humana es mucho más sutil que en los ratones, en los que se ha comprobado que el alelo *d* de la clase I, *locus* L del MHC, es un determinante clave para la respuesta del hospedador (79). Se ha visto recientemente que se debe a una proteína singular del parásito, la GRA 6 antes mencionada, que está eficientemente representada por L^{d} (80). Posiblemente los ratones de un haplotipo distinto no presentan este epítopo clave, lo que causa una respuesta inmune muy distinta (16).

En la especie humana el MHC también debe desempeñar algún rol relevante pero los datos disponibles sugieren que esto constituye un aspecto menor en la variabilidad observada en la enfermedad humana.

Las rutas apoptóticas de las células infectadas están rotas. La apoptosis es un mecanismo fundamental de las células para eliminar las inservibles y perjudiciales al organismo. Nada tiene de extraño que muchos microorganismos infectantes hayan desarrollado mecanismos para bloquear la apoptosis. *T. gondii* dispone de diversos medios para lograrlo, entre ellos el bloqueo de la función de la caspasa (81). NFxB es un factor de transcripción que desempeña un papel central en la apoptosis cuya expresión está muy alterada en las células infectadas por *Toxoplasma* (82, 83).

II.8. DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y VACUNACIÓN

La técnica de la PCR es muy sensible en el diagnóstico de la toxoplasmosis. La aplicación de esta técnica a la detección de los agentes infecciosos fue una auténtica revolución, sin embargo, su alto coste y sus dificultades técnicas, más la ausencia de parásitos y DNA circulantes ha limitado mucho su empleo con fines diagnósticos. No obstante, ha sido muy útil para la detección de *T. gondii* en el medioambiente y en situaciones en las que el diagnóstico de la infección aguda es de gran interés para la atención clínica del paciente. Por ejemplo, para comprobar si el parásito ha traspasado la placenta e infectado al feto (84).

La PCR forma ya parte del instrumental a disposición del clínico, pero es de escaso valor para conocer los antecedentes e historia de la enfermedad (esto es, si se trata de una infección crónica) ya que el DNA del parásito no se encuentra en las muestras que se toman corrientemente, como por ejemplo, sangre periférica. La PCR, además de contestar a la pregunta de si están presentes los parásitos en las infecciones agudas, se usa asímismo para determinar la estirpe o cepa de *T. gondii* responsable de la infección (85).

La serología distingue la infección aguda de la crónica y quizá podría indicar qué estirpe del parásito está implicada.

En muchos casos conviene saber si la infección ha sido adquirida recientemente o se trata de una crónica. De aquí que las pruebas que, con una mínima invasión, diferencian entre ambas situaciones sean instrumentos de gran valor clínico. En la mayoría de los casos funcionan mejor las técnicas de dos pasos: análisis del título de IgM primero, seguido de los ensayos con avidina-IgG (86).

Puesto que el tipo y gravedad de las toxoplasmosis humanas varían, es obvio que se necesitan técnicas no invasivas que detecten el tipo y la cepa responsables de la enfermedad en cada caso. Poner de manifiesto el parásito por PCR es relativamente fácil, lo dificultoso estriba en conseguir material parasitario del paciente. En su lugar se ha intentado el empleo de técnicas serológicas con péptidos específicos de estirpe para buscar sus anticuerpos específicos (87, 88). Aunque muy rudimentaria, esta técnica se ha visto que funciona en un estudio realizado con un número muy escaso de personas con toxoplasmosis cuya estirpe se conocía (16).

La terapéutica farmacológica de las toxoplasmosis se ha centrado en los inhibidores del metabolismo nucleotídico del parásito, concretamente en los fármacos *pirimetamina* y compuestos *sulfa* que inhiben la dihidrofolato reductasa

y la dihidropteroato sintasa, respectivamente. Podría argumentarse que uno de los avances más importantes del tratamiento de la toxoplasmosis fue el hallazgo de la terapéutica combinatoria del trimetoprim y sulfametoxazol, usados para tratar la neumonía por pneumoquistes de los enfermos de SIDA, que también ejerce un efecto significativo en *Toxoplasma* (89). Aunque esta práctica ha salvado muchas vidas, no fue algo inesperado, pues muchos ensayos previos demostraron la eficacia de esta combinación de fármacos en el tratamiento de la toxoplasmosis.

En 1983 se comprobó que varios fármacos nuevos tenían gran eficacia terapéutica en el tratamiento de las toxoplasmosis al interferir de forma "desproporcionada" las funciones de las organelas. La *atovaquona*, un análogo de la ubiquinona, que se sintetizó originalmente para el tratamiento del paludismo, se ha visto que, también es eficaz frente a *T. gondii* (90). La diana de este fármaco es el transporte mitocondrial de electrones, concretamente el citocromo b y tanto en *T. gondii* (91) como en *Plasmodium* (92).

La introducción en 1983 de la terapéutica combinatoria antirretroviral de alta actividad (en inglés HAART = *H*ighly *A*ctive *A*nti-*R*etroviral *T*herapy) ha permitido controlar el SIDA en los países ricos y al mismo tiempo, casi ha hecho desaparecer la encefalitis toxoplásmica de estos pacientes, posiblemente porque el sistema inmune de los tratados alcanza un nivel lo bastante fuerte para controlar la reactivación de *Toxoplasma gondii* (16). La encefalitis toxoplásmica de estos enfermos de SIDA se diferencia de otras enfermedades del SNC, que pueden afectarles, mediante técnicas de imagen no invasivas. La tomografía computerizada (CT) y la imagen por resonancia magnética han permitido un mejor diagnóstico y por tanto, un mejor tratamiento etiológico (93).

La *clindamicina* es un antibiótico que inhibe el mecanismo traduccional de los procariotes, habiéndose comprobado que es un fármaco eficaz de segunda línea frente a *Toxoplasma gondii*. Su diana son los ribosomas del plástido (43, 67). Resulta curioso que el efecto del fármaco sufra un retraso tan grande que sólo después de varias divisiones impide el desarrollo del parásito (94). Esto podría deberse a que su efecto, depende de la pérdida completa del DNA plastídico, y dado que el número de copias para empezar es relativamente grande (unas 8 moléculas de DNA/plástido), requiere que ocurran antes varias divisiones del parásito (43).

Las perspectivas como vacunas de los parásitos atenuados son buenas. Las estirpes candidatas a vacunas se han originado de diversos modos. Una táctica que produjo una estirpe disponible comercialmente se basa en pases seriados

por ratones. Así se obtuvo la estirpe o cepa S48 que manteniendo toda la infectividad de la fase aguda ha perdido su capacidad de convertirse en bradizoitos y por lo tanto se elimina al terminar la fase de infección aguda (95). Esta estirpe puede usarse para infectar a una oveja de forma aguda antes de entrar en gestación, de modo que cuando la cubra un morueco, el feto que se origina esté protegido por la respuesta inmune materna. Afortunadamente la infección aguda de las ovejas adultas no es grave.

También se han producido mutantes termosensibles usando al azar la mutagénesis química y el cribado selectivo (96). Son atenuadas para desarrollarse en los animales y se han investigado como vacunas potenciales, pero no lo suficiente para permitir su explotación comercial (96, 97). Recientemente se han obtenido genes diana por deleción. La auxotrofía así lograda no revierte, por supuesto, lo que tiene muchas ventajas frente a las dos técnicas anteriores en las que siempre es posible la reversión.

El éxito más llamativo de modificación genética ha sido la deleción de la carbamato-fosfato-sintetasa II, una enzima indispensable para la síntesis de pirimidinas (98). Los parásitos modificados genéticamente crecen *in vitro* si se les proporciona uracilo en exceso pero están muy discapacitados y son incapaces de causar la enfermedad *in vivo* si no disponen, como antes de uracilo en abundancia. Resultado de todo ello es una fuerte protección frente a una infección subsiguiente.

II.9. *TOXOPLASMA* Y COMPORTAMIENTO

Desde los años 80 del siglo pasado se ha sugerido que la infección por *T. gondii* podría alterar el comportamiento del hospedador. La posibilidad de que la infección toxoplásmica cambiase el comportamiento de su hospedador y por ello se aumentase el contagio fue reconocida por Webster *et al*. en 1994 (99). La evidencia de que así ocurre la proporcionan diversos experimentos recientes en los que ratas pardas (*Rattus norvegicus*) con toxoplasmosis crónica, perdieron su miedo congénito a los gatos convirtiéndose así en presas fáciles para ellos (100). Puesto que los gatos son grandes dispersores de ooquistes de *T. gondii* (un solo gato difunde por su medioambiente unos 10^8 ooquistes), la conversión de un hospedador intermediario —como la rata— en una presa fácil de los gatos cazadores es una ventaja selectiva importante para el parásito. Pero es imposible pretender demostrar que esto sea la causa del cambio de comportamiento; en su lugar debemos conformarnos con razones basadas en evidencias circunstanciales. Una de ellas sería que los efectos del comportamiento son muy

específicos: por ejemplo, el miedo innato a los perros, al igual que a bastones punzantes y a otros miedos aprendidos (101).

En la especie humana se han descrito ciertas correlaciones entre seropositividad a *T. gondii* y determinados comportamientos como, por ejemplo, riesgo de sufrir un accidente de tráfico (102) o de padecer una enfermdad psiquiátrica de tipo esquizofrénico (103), algunos de ellos ocurridos muchos años antes. Desgraciadamente molestar a todos los demás disturbados o confundidos sería una tarea enorme. Por ejemplo, la predisposición a un comportamiento de riesgo daría lugar a una mayor probabilidad de ambas, la conducción peligrosa y la ingestión excesiva de comida (que llevaría a una mayor infección toxoplásmica). Ni siquiera los estudios prospectivos seguidos con grandes cohortes buscando la seroconversión *versus* el desarrollo de condiciones psiquiátricas darían, seguramente, respuestas definitivas (16).

Por consideraciones éticas debe notificarse a quienes son seroconversores (esto es, productores de anticuerpos) este hecho y tal notificación podría desencadenar un cambio psiquiátrico o de comportamiento.

II.10. CICLO BIOLÓGICO DE TOXOPLASMA GONDII

En la década iniciada en 1970 quedó perfectamente establecido el ciclo biológico de *T. gondii*. Varios investigadores (7, 8, 11, 104, 105) constataron que la fase sexual del parásito tenía lugar en los félidos, incluido el gato, que con las heces eliminaban millones de ooquistes inmaduros que diseminaban por todo su biotopo. Como ha escrito Euzèby (10), *Toxoplasma gondii* se caracteriza por su multiplicación facultativa de tipo monoxeno o dixeno.

II.10.1. Ciclo dixeno o ciclo largo (*Figura II.2*-II)

En este ciclo interviene la depredación y/o el carnivorismo (o sarcofagia) del hospedador definitivo. Se inicia con la ingestión de los quistes tisulares o parenterales que albergan los hospedadores intermediarios [prácticamente todos los animales homeotermos, desde los animales de renta y mascotas, hasta animales exóticos —nutrias marinas de California y la especie humana (106)]. Es el ciclo más frecuente.

Los felinos que padecen toxoplasmosis eliminan con las heces ooquistes "inmaduros" que si caen en terreno adecuado (75-85% de humedad y 25-40 ºC

de temperatura; óptima 30 ºC) inician una esporogonia que termina con la formación de 2 ooquistes (esporoquistes) que contienen cada uno 4 esporozoitos; tienen, por tanto, poder infectante, de aquí que también se les llame "maduros". Los ooquistes son muy resistentes en el medio ambiente.

Cuando los hospedadores intermediarios ingieren ooquistes esporulados o maduros, se liberan los esporozoitos en el tracto gastrointestinal, penetrando en las células intestinales (enterocitos) y en los correspondientes nódulos linfáticos, transformándose en taquizoitos que se multiplican rápidamente. Después de producirse varias taquiesquizogonias que originan numerosos taquizoitos, algo caracterísitco de la fase aguda de la toxoplasmosis, si el hospedador no muere, entra en un estado inmunitario en el que se frena la multiplicación del parásito y los taquizoitos se sustituyen por bradizoitos, que agrupándose forman quistes tisulares (9, 10). Los tejidos en los que preferentemente se enquistan los bradizoitos son los músculos estriados (esqueléticos y cardiacos) y el encéfalo, la enquistación hace que la infección se convierta en crónica, o mejor dicho, en latente, puesto que si el hospedador contrae una condición inmunosupresora los quistes se reactivan, agudizándose nuevamente la toxoplasmosis (10).

Si un hospedador intermediario y parasitado es devorado por un gato u otro félido, o si éste se alimenta de carne cruda o procesada a baja temperatura (< 50 ºC en el punto de calentamiento más tardío) de un portador de quistes tisulares, en el tracto gastrointestinal del félido se liberan los bradizoitos de los quistes que después de completar las correspondientes esquizogonias, gametogonias y fecundación, dan lugar a ooquistes que repetirán el ciclo descrito.

El ciclo dixeno implica siempre la existencia de un hospedador intermediario.

II.10.2. Ciclo monoxeno o ciclo corto (*Figura II.2*-I)

Este ciclo acaece cuando los gatos se infectan al ingerir por depredación, carnofagia u otra circunstancia, carne contaminada con ooquistes esporulados del suelo, agua, etc. Es mucho menos frecuente que el ciclo largo o dixeno ya estudiado.

Como se dice más atrás, los ooquistes esporulados son muy resistentes y en los biotopos húmedos y protegidos del sol, resisten muchos meses en el medio ambiente en condiciones de viabilidad; los desinfectantes químicos corrientes, salvo el amoniaco al 10% (5% en caliente) no los afectan, sin embargo, la fermentación y la putrefacción los destruyen (25, 104). De aquí que el empleo de

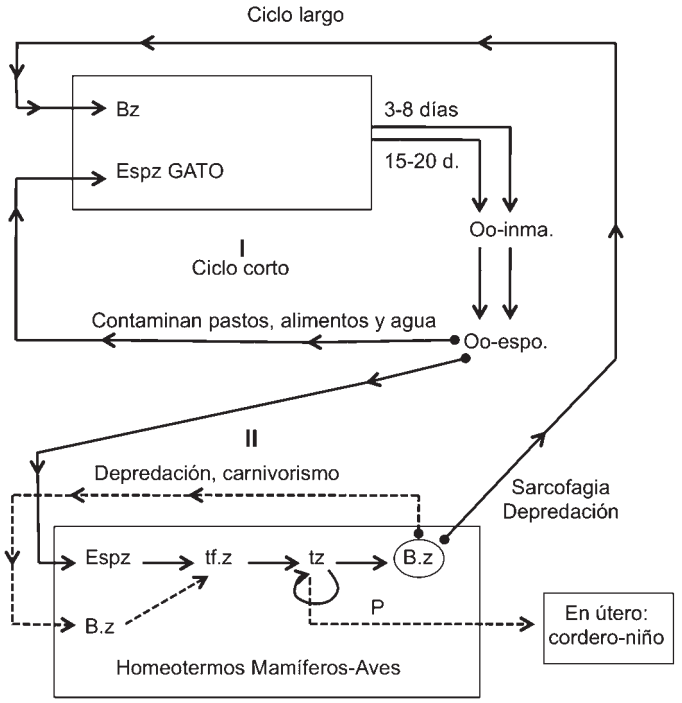


Figura II.2. *Los dos ciclos evolutivos de T. gondii (De Euzèby (10) con ligeras modificaciones). Notas: I = Ciclo corto; II = Ciclo largo; • = Inicio.*

biocidas corrientes en biotopos contaminados le resulte favorable a *T. gondii* al destruir a sus agentes competidores, los microorganismos responsables de la putrefacción y fermentación.

Los esporozoitos liberados por los ooquistes infectantes ingeridos no penetran directamente en los enterocitos ya que a éstos solo los infectan los bradizoitos. Los linfocitos intraepiteliales los distribuyen por diveros tejidos extraintestinales (véase Figura II.3) donde completan un ciclo de tipo toxoplásmico (10), con taquiesquizonias, seguidas de bradiesquizogonias para originar finalmente los bradizoitos que invaden los enterocitos. Por tanto, en los gatos hay una fase toxoplásmica extraintestinal que precede a la coccidiósica o intestinal. Como señala Euzèby, la pérdida del hospedador intermediario la compensa la localización intraintestinal, fenómeno corriente en parasitología (10).

El ciclo monoxeno de *T. gondii* no requiere hospedador intermediario, por ello se conoce también como ciclo corto. En realidad su periodo prepatente en

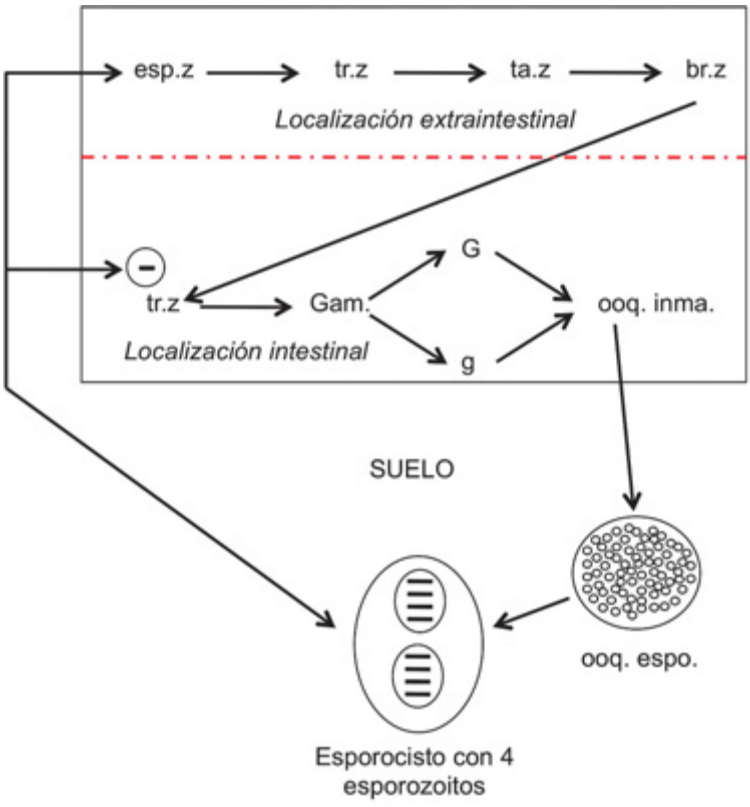


Figura II.3. *Fase endógena del ciclo monoxeno de T. gondii en el cerdo. (De Euzèby (10) con ligeras modificaciones).*

los gatos es más largo (15-20 días) que en el ciclo dixeno, pues éste aporta unos bradizoitos preformados en el hospedador intermediario con capacidad de invadir los enterocitos desde que se infecta el gato, mientras que cuando este animal se infecta con ooquistes esporulados y esporozoitos, los bradizoitos infectantes de los enterocitos primero tienen que desarrollarse en localizaciones extraentéricas (105, 107).

Los taquizoitos originados durante las taquiesquizogonias pueden atravesar la placenta y asentarse en los fetos provocando así una toxoplasmosis congénita, prenatal o consecutiva a una reactivación de los quistes *latentes*. La placenta no la atraviesa *T. gondii* por vía sanguínea sino por vía tisular por necrosis progesiva y perforación de los tejidos placentarios (25, 108).

Otro carácter singular del ciclo biológico de *T. gondii* es que puede desarrollarse entre hospedadores intermediarios, sin la participación de gatos (*Figura II.2*-II): los bradizoitos originados en los hospedadores intermediarios son infectantes para cualquiera de ellos que ingiera tejidos portadores de quistes. Contrariamente a lo que ocurre en el gato, en los hospedadores intermediarios los bradizoitos no infectan los enterocitos, sino que se dispersan por todo el organismo, donde experimentan taquiesquizogonias (toxoplasmosis aguda, no simpre sintomática) que van seguidas de bradiesquizogonias y de formación de quistes tisulares. A esta singularidad se debe el contagio humano por el consumo de carne parasitada.

II.11. TOXOPLASMOSIS HUMANAS Y ANIMALES: CONTAGIO

La toxoplasmosis que, en sentido estricto solo afecta al gato, también puede desarrollarse en otras muchas especies de animales receptivos a los que se conoce como hospedadores intermediarios. La especie humana forma parte de ellos como intermediario potencial o paraténico (11).

Aunque el ciclo biológico del parásito puede completarse, sin intervención del gato, en los hospedadores intermediarios que lo adquieren por predación, canibalismo o consumo de carne cruda, el gato y unos pocos félidos salvajes son los reservorios fundamentales o básicos que desempeñan el rol principal en la llamada, por Euzèby, coccidiosis toxoplásmica intestinal (10).

II.11.1. Contagio de los gatos

Estos animales contraen la enfermedad por consumir carne, por ello solo eliminan ooquistes con las heces cuando empiezan a ingerir este alimento (en torno al mes y medio de su nacimiento). Hasta entonces están protegidos por la inmunidad pasiva, de origen materno, debida a las inmunoglobulinas que les transmitieron sus madres por vía transplacentaria y calostral (109).

Consecuentemente, la infección se debe a la ingestión de carne o despojos crudos (o “poco hechos”) domésticos y de industrias de restauración que contienen quistes tisulares viables; de aquí que los alimentos comerciales, enlatados y procesados a temperaturas y tiempos de esterilización, siguiendo las buenas prácticas de fabricación fijadas para esta industria, carezcan de poder infectante.

Se ha comprobado que la seropositividad de los gatos aumenta al hacerlo la edad. Por ejemplo, se ha visto que el 22% de los gatos seropositivos son menores de un año, mientras que en los de 10 años o más llegaba al 80%. También se ha comprobado que en los gatos que nunca abandonan su hogar, el número de seropositivos es mucho menor que en los que tienen acceso libre al exterior o llevan vida errante o asilvestrada (110).

La eliminación de ooquistes con las heces acaece en los gatos al final del periodo prepatente (unos 5-6 días) si se debe al consumo de carne (caso más frecuente), o a los 15-16, si la infección se debe a la ingestión de ooquistes esporulados que contaminan suelos, hortalizas y aguas de riego y de bebida. Durante el periodo patente, aproximadamente 10-15 días, el gato excreta millones de ooquistes que dispersa por su entorno en un círculo de 3-7 Km de diámetro. Cuando acaba el periodo patente ha eliminado toda su carga de ooquistes; a ello se debe el que la denominada coccidiosis toxoplásmica sea autolimitante (10). Si un gato alcanza este grado de inmunidad y se enfrenta a otra reinfección, los parásitos se destruyen, bien en el intestino (si se trata de quistes de bradizoitos) bien en los tejidos, si son esporozoitos libres procedentes de ooquistes esporulados. La inmunidad alcanzada por el gato es multivalente y eficaz frente a las diferentes formas o fases de *Toxoplasma*. Teóricamente al menos, los gatos mayores de 4-5 meses no eliminan ooquistes (111).

No obstante, esta inmunidad no permanece indefinidamente, durante toda la vida gatuna, despareciendo a partir de los 4-5 años; también puede romperse, en ciertas circunstancias, y los quistes de ubicación extraintestinal reactivándose liberan bradizoitos que reinfectarán los enterocitos (109).

II.11.2. Contagio de hospedadores intermediarios (animales)

Aunque el gato sea el reservorio primario de *T. gondii*, no siempre es el responsable directo de las toxoplasmosis animales. Los hervíboros se infectan al comer pastos contaminados con ooquistes esporulados o al ingerir accidentalmente hospedadores de transporte, como caracoles e insectos coprófagos que los contienen. La epidemiología de la toxoplasmosis de los animales hervíboros presenta algunas lagunas, pues ni en todas las granjas hay gatos que actúen como fuente de ooquistes, ni éstos a pesar de su resistencia, justifican algunas infecciones que llegan al 70% de la población en ciertos rebaños ovinos. Aunque algunos hospedadores de transporte participen en estas infecciones, su papel es meramente complementario.

Conviene señalar que en los lanares se han descrito casos de infección por la ingestión de placentas de ovejas recién paridas, es lo que se conoce como contaminación lateral (112).

En la especie ovina y en algunas otras, las hembras parasitadas y en fase aguda de la infección —que suele ser clínicamente inaparente— transmiten a sus fetos por vía transplacentaria taquizoitos. La transmisión depende del tipo de placenta: en las epiteliocoriales (rumiantes y cerdos) y en las hemocoriales (lepóridos) es posible la infección prenatal. Esto ocurre con cierta frecuencia en las ovejas cuya placenta es una multibarrera entre el feto y la circulación sanguínea de la madre. En los tejidos de las barreras se multiplican bien algunos taquizoitos ocasionando focos necróticos que favorecen la invasión fetal (10, 11, 112).

La infección solo es posible si se trata de una madre primoinfectada durante la gestación. Las ovejas que se infectan antes de la gestación adquieren inmunidad humoral con lo que se destruyen los taquizoitos circulantes, evitándose así su paso a través de la placenta; además, el paso transplacentario de IgG, por su efecto letal en los taquizoitos, protege al feto de los parásitos que pudieren haberlo afectado. Esto explica que las hembras abortadas por *T. gondii*, tras su vuelta a la normalidad, estén protegidas frente a nuevas infecciones a no ser que éstas sean consecuencia de algún tipo de inmunosupresión.

En las especies omnívoras (cerdo) la toxoplasmosis puede deberse a la ingestión de roedores (ratas y ratones) portadores de quistes. Se ha visto que en regiones con una higiene animal deficiente hay una relación directa entre número de cerdos parasitados y número de roedores portadores de *T. gondii*.

II.11.3. Contagio humano

Toxoplasma gondii infecta a la especie humana de dos modos distintos: 1. Por ingestión de ooquistes esporulados o maduros, y 2. Por ingestión de quistes tisulares que contienen bradizoitos.

II.11.3.1. Por ingestión de ooquistes esporulados

Se ha dicho más atrás que los ooquistes expulsados con las heces por los gatos son muy resistentes a las condiciones medioambientales y que su ingestión acaece por el consumo de alimentos y bebidas a los que contaminan, o por el contacto manual con tierra y heces de gato que los contienen. Para que los

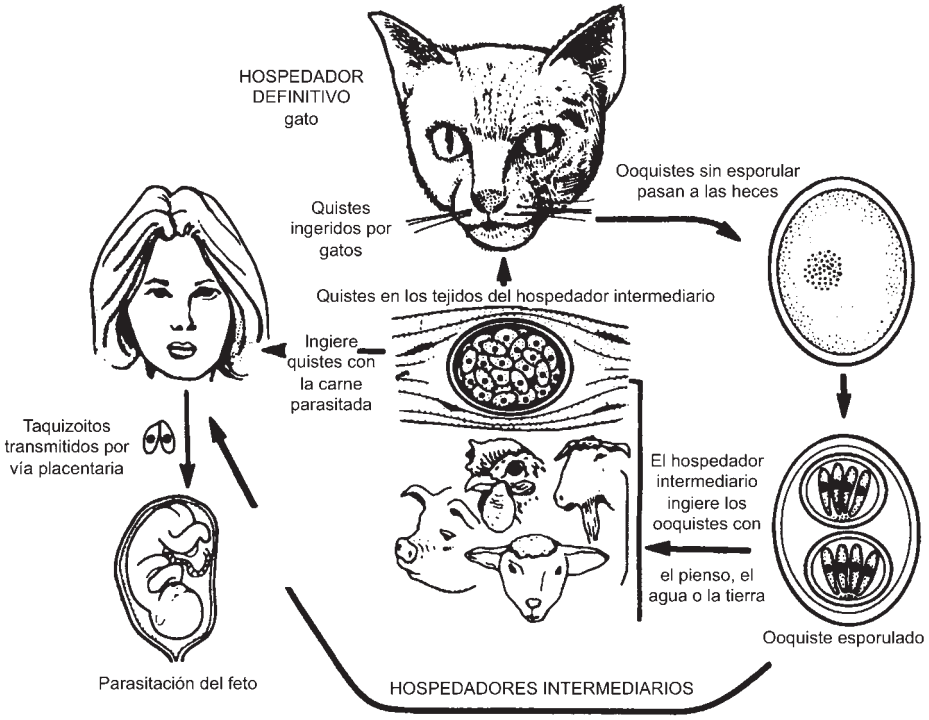


Figura II.4. *Ciclo biológico de T. gondii (de la referencia 25).*

ooquistes diseminados por las heces sean infectivos deben haber esporulado, lo que tiene lugar después de 2-3 días de permanencia en el exterior, bajo condiciones de temperatura y humedad adecuadas (Figura II.2 y Figura II.4). Por ello, teóricamente el contacto con gatos limpios, mantenidos en buenas condiciones de higiene no debería posibilitar la infección, excepto si los animales al lamer objetos ensuciados con tierra y excrementos o lodos contaminados con ooquistes los trasladasen a su pelo al lamerse la piel y más tarde (1-3 días) los acariciase una persona que, de no lavarse las manos, podría transportarlos a su boca.

II.11.3.2. Por ingestión de quistes tisulares

Recordemos que los quistes tisulares se encuentran viables, no sólo en la carne de los animales de abasto parasitados por *T. gondii*, sino también en los

productos de casquería y en los embutidos crudos sin curar (9, 106, 109). Todos estos alimentos, si durante su proceso culinario no sufren un tratamiento térmico letal para el parásito, son infectantes por vía oral.

Todos los animales de abasto, incluídas las aves, sirven de hospedadores intermediarios de *T. gondii* pero los más frecuentemente implicados son los cerdos (con porcentajes de parasitación de hasta el 70%) y los corderos (que llegan hasta el 48% de los animales del rebaño), les siguen los équidos y cabras y por último el ganado vacuno cuya tasa de infección es mucho menor que las señaladas. Las liebres son igualmente transmisoras potenciales del parásito a la especie humana, si bien esto no es fácil que suceda, ya que los quistes tisulares raramente serán infectivos; además, cuando la carne de liebre llega al comedor es siempre después de sometida a una larga cocción, dada su dureza natural. Las aves, en general, están muy poco parasitadas. Más atrás (pág. 43) se ha señalado que los osos abatidos en cacerías pueden ser una fuente de contagio para el hombre en aquellos países donde se acostumbra a comer su carne.

Los quistes perduran en las masas musculares y en el miocardio varios años, sobre todo en los cerdos. Son termolábiles y sensibles a la desecación industrial por lo que solo son infectantes en la carne fresca y no en la deshidratada hasta niveles de actividad de agua (a_w) incompatibles con la vida microbiana.

Quienes manipulan la carne parasitada sin prestar la debida atención a la higiene del producto y a la suya personal pueden contaminarse los dedos con quistes, que si llegan a la boca y se ingieren originan una infección toxoplásmica.

A mediados del siglo pasado tuvo lugar en Vancouver (Canadá) un brote de toxoplasmosis que afectó a más de un centenar de personas que presentaron síntomas propios de la enfermedad y especialmente una coriorretinitis grave. Aunque no se identificó la fuente, se piensa que se debió a los ooquistes de *Toxoplasma* que contaminaban los depósitos de agua municipales (25).

En la Figura II.4 se muestra un dibujo esquemático del ciclo biológico de *T. gondii* y de las vías principales de contagio humano (25).

II.12. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA TOXOPLASMOSIS HUMANA

Como se indica en páginas anteriores, tres son las principales vías de transmisión de la toxoplasmosis: 1) ruta fecal oral, 2) ruta sarcofágica por consumo de carne cruda o “poco hecha” y 3) ruta transplacentaria o congénita.

En la fecal oral el papel fundamental lo desempeñan los gatos domésticos que son la única fuente urbana productora y diseminadora de ooquistes. El rol de otros felinos en la transmisión de toxoplasmas en ciudades y pueblos de países desarrollados es meramente circunstancial y limitado a parques zoológicos y terrenos que ubican circos donde se presentan números de doma de felinos. El contagio de la toxoplasmosis por esta ruta requiere, como condición indispensable, que los ooquistes diseminados con las heces de los gatos alcancen —después de maduros o esporulados— el tracto gastroentérico y lleguen al intestino (104).

La ruta sarcofágica o por ingestión de carne —conocida también como carnivorismo— se debe al consumo de carne cruda o poco hecha, parasitada con quistes tisulares cuyo poder infectante persiste durante toda la vida de los hospedadores intermediarios. La ingestión de esta carne, de las vísceras correspondientes y de otros tejidos que contengan quistes tisulares viables es la fuente de contagio más frecuente (25). Mientras en los países industrializados el consumo de carne cruda o poco hecha es un factor de transmisión más importante que la ingestión accidental de ooquistes esporulados, en los países en vías de desarrollo sucede lo contrario (25, 104), ya que ingieren la carne muy hecha (temperaturas culinarias altas durante mucho tiempo).

Los hábitos alimentarios también son importantes, así el 84% de las embarazadas parisinas presentan anticuerpos contra *T. gondii*, lo que contrasta con el 32% de las neoyorquinas y el 22% de las londinenses. Se admite que ello se debería a que en Francia, en general, se consume la carne muy poco hecha, casi cruda, algo que es bastante más raro en Nueva York y sobre todo en Londres (25, 104, 106).

La vía transplacentaria, conocida igualmente como ruta congénita (106), solo se observa en algunas hembras gestantes (principalmente en lanares y porcinos) y también en mujeres embarazadas que contraen la infección primaria por la ingestión de ooquistes esporulados o, lo que es más frecuente, por el consumo de carne y productos cárnicos que contengan quistes tisulares viables. Si éstos no se destruyen sometiendo la carne cruda a la acción del calor, del frío o de la irradiación (véase más adelante), *T. gondii* llega al feto, vía la placenta, causándole la toxoplasmosis congénita que, a menudo, le produce la muerte o secuelas graves que se manifiestan después del nacimiento (10, 25, 104, 106).

El papel de los gatos en la epidemiología de la toxoplasmosis es muy importante; se ha visto que después de devorar un ratón parasitado con quistes tisulares eliminan entre $3x10^5$ y 10^8 ooquistes (23, 25, 109), cuya capacidad in-

fectiva persiste en el suelo más de un año a temperaturas entre 4 y 37 ºC. Resisten bastante bien la sequía medioambiental, pero su poder infectante se reduce mucho después de 10 días de permanencia a una humedad relativa del 50-70%. Las heladas invernales (congelación natural del suelo) apenas influyen en su resistencia (106).

Los gatos del medio rural generalmente tienen libertad para salir de sus hogares y, a veces, llevan una vida semisalvaje o asilvestrada, en graneros, silos, almacenes y otras dependencias similares (8, 25). En estas condiciones suelen tener más de un parto/año, lo que asegura una gran población gatuna y un entorno con abundancia de ooquistes. En estos ambientes la ruta sarcofágica por predación de gorriones y pájaros semejantes, además de topillos, ratones, etc., alcanza gran importancia y en ciertas explotaciones ganaderas, carentes de higiene, los gatos se infectan al tener acceso a placentas y fetos muertos de los abortos toxoplásmicos ovinos (109).

II.12.1. Medios de lucha

Conocidos los reservorios o fuentes primarias de ooquistes (gatos) y las rutas de transmisión o contagio de la enfermedad, hay que referirse ahora a los medios de lucha que deben implementarse frente a la toxoplasmosis; son fundamentalmente tres: 1) Mantener los gatos libres de *T. gondii*, 2) Evitar el contacto con el parásito y su difusión y 3) Impedir el consumo de alimentos —especialmente carne— que contengan formas viables de *T. gondii*.

II.12.1.1. Gatos libres de T. gondii

Puesto que son animales carnívoros necesitan que la carne forme parte importante de su comida, de aquí que si se alimentan con recortes de carnicería y productos de casquería deban someterse a ebullición durante, al menos, 15 minutos y bajo ningún concepto se les suministrarán crudos o poco hechos. Dado que actualmente se encuentran en el comercio alimentos enlatados industrialmente, procesados de acuerdo con las BPF (buenas prácticas de fabricación), y preparados para cubrir las necesidades nutritivas de estos animales, en diferentes etapas de su vida, se preferirán a los elaborados y cocinados en casa.

Para sustituir la arena y serrín de la caja donde defecan los gatos y para limpiarla deberán usarse guantes de goma desechables. La limpieza de la caja, de la

jaula de transporte y del suelo y entorno donde se encuentren se realizará también usando guantes desechables y empleando agua, jabón y buen cepillo. Finalmente se pasará una bayeta con lejía. Inmediatamente de terminadas estas operaciones, quien las haya realizado se lavará bien las manos con agua, jabón y cepillo de uñas.

Hay que procurar que los gatos no salgan del hogar, lo que es difícil y a veces, inevitable por la tendencia de estos animales a explorar nuevos territorios y por su instinto predador que los lleva a cazar y a ingerir sus presas que podrían albergar quistes tisulares viables. Los gatos, y especialmente los machos, en época de celo de las hembras, procuran ausentarse de sus casas en ocasiones varios días, implicándose en peleas con sus congéneres; a su vuelta al hogar su aspecto es lastimoso y desagradable; para evitarlo se ha recomendado la castración de los animales, previa consulta del veterinario (106).

Vistos los inconvenientes de la convivencia con gatos en el medio rural, conviene recordar que la limpieza a fondo de graneros y almacenes y la disponibilidad de puertas y ventanas que cierren bien impiden la difusión de ooquistes por tales dependencias y la recogida (en recipientes metálicos, fáciles de lavar y de cierre hermético), de placentas y fetos de abortos toxoplásmicos ovinos o de otro ganado, son buenas medidas complementarias de control.

II.12.1.2. Evitar el contacto con el parásito y su difusión

Se consigue con la aplicación de cuanto se ha señalado en el punto anterior. Recuérdese también que debe evitarse todo contacto con los hospedadores de transporte, como babosas, coleópteros zoófagos e insectos coprófagos; suelen encontrarse en jardines, huertos, corralizas y otros lugares del medio rural y aunque en tales hospedadores no se multiplique *T. gondii*, sí que actúan como dispersores de los ooquistes del suelo (10).

II.12.1.3. Impedir el consumo de alimentos con formas viables de T. gondii

A título individual esta es la medida profiláctica más recomendada, tanto en la especie humana como en los animales de compañía. Por otro lado, la carne cruda o poco hecha es el alimento que más veces ha estado implicado en casos de toxoplasmosis humana.

El tratamiento térmico de la carne y la congelación, debidamente aplicados, destruyen los ooquistes de *T. gondii* y los quistes tisulares (113, 114). La irra-

diación a dosis de 0,75-1,0 kGy también es letal para los toxoplasmas según se ha comprobado a nivel de planta piloto, pero a nivel industrial el equipo y utillaje requerido resulta demasiado caro para los mataderos actuales y prácticamente es incompatible con el trabajo en cadena de estos establecimientos.

El tratamiento en hornos de microondas de la carne no asegura la destrucción del parásito porque el calor no difunde de manera homogénea, ni penetra suficientemente en el alimento.

Ni la salazón, ni el ahumado destruyen los quistes tisulares de la carne cruda, en cambio en embutidos crudos de picado fino, como el salchichón, chorizo de Pamplona y similares, que se elaboran con carne cruda, tocino, especias y sales nitrificantes y que durante el proceso de secado experimentan una fermentación láctica espontánea o dirigida (con cultivos de bacterias lácticas) los quistes del producto terminado carecen de actividad.

La congelación a temperaturas de -25 ºC, o menores durante 5 días o más, es suficiente para la destrucción de los quistes. En la Tabla II.2 se indican las temperaturas y tiempors requeridos para la inactivación y muerte de quistes tisulares de la carne bovina y porcina.

Las verduras contaminadas con ooquistes de *T. gondii*, debidamente lavadas y sometidas a ebullición, no constituyen peligro alguno.

En leche pasteurizada nunca se han encontrado quistes toxoplásmicos viables, sin embargo, la leche cruda de cabra, según Murrell (106), se ha visto implicada en brotes humanos muy pequeños (≤ 12 casos/brote), lo que pone de manifiesto el gran valor higienizante de este proceso. Concluye recomendando que en las zonas rurales de países en vías de desarrollo, no se consuma jamás leche cruda sin someterla previamente a ebullición durante, al menos 10 minutos.

TABLA II.2. *Temperaturas y tiempos recomendados para destruir los quistes de T. gondii en filetes de carne bovina y porcina* de un grosor ≤ de 5 cm.*

Tratamiento térmico		**Congelación rápida**	
Temperatura	**Tiempo**	**Temperatura**	**Tiempo**
60 ºC	15 minutos	-25 ºC	5 días
70 ºC	8 minutos	-35 ºC	3 días
80 ºC	3 minutos	-40 ºC	1 y ½ días

* De varias fuentes.

II.13. BIBLIOGRAFÍA

1. Dubey, J. P. (1993) *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidian of humans and animals. En *Parasitic Protozoa*, Vol. 6, págs. 1-158. Nueva York, Academic Press.

2. Roberts, T. & Frenkel, J. K. (1990) Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **196:** 248-256.

3. Nicolle, Ch. & Manceaux, L. (1908) Sur une infection à Coprs de Leishmann (ou organismes voisins) du gondi. *Comptes Rendues de l´Academie des Sciences*. **147:** 763-766.

4. Nicolle, Ch. & Manceaux, L. (1909) Sur une protozoaire nouveau du gondi. *Comptes Rendues de l´Academie des Sciences*. **148:** 369-372.

5. Nicolle, Ch. & Manceaux, L. (1909) Sur une protozoire nouveau du gondi. *Archives de l´Institute Pasteur de Tunis*. **2:** 97-103.

6. Hutchinson, W. M., Dunachie, J. F., Siims, J. C. & Work, K. (1970) Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *British Medical Journal*. **1:** 142-144.

7. Frenkel, J. K., Dubey, J. P. & Miller, N. L. (1970) *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. **167:** 893-895.

8. Dubey, J. P. (1977) *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissue cysts-forming coccidian of man and animals. En Kreiner, J. P. (ed.) Parasitic Protozoa, Vol III. *Gregarines*, *Haemogregarines*, *Coccidia*, *Plasmodia* and *Haemoproteids*. Academic Press, New York.

9. Feldman, H. A. (1982) Epidemiology of Toxoplasma infections. *Epidemiological Reviews*. **4:** 204-213.

10. Euzéby, J. (2001) *Los parástios de la carne*. Editorial Acribia. Zaragoza (Traducción de *Les parasites des viandes*. Technique et Documentation-Lavoisier, por los Drs. Acedo, Cacho Malo, Quilez Cinca y López Bernal).

11. Levine, N. D. (1978) *Textbook of Veterinary Parasitology*. Burgess Publising Co. Minneapolis, Minnesota.

12. Darde, M. J., Bouteille, B. & Pestre-Alexandre, M. (1992) Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *Journal of Parasitololgy*. **73:** 786-794.

13. Howe, D. K. & Sibley, L. D. (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages; correlations of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases*. **172:** 1561-1566.

14. Saeij, J. P., Boyle, J. P. & Boothroyd, J. C. (2005a) Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology*. **21:** 476-481.

15. Su, C., Evans, D., Cole, R. H., Kissinger, J. C., Ajioka, J. W. & Sibley, L. D. (2003) Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*. **299:** 414-416.

16. Boothroyd, J. C. (2009) *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *International Journal for Parasitology*. doi: 10.1016/jijpara.2009.02.003.

17. Lehmann, T., Marcet, P. L., Graham, D. H., Dahl, E. R. & Dubey, J. P. (2006) Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the Royal National Academy of Sciences USA*. **103:** 11423-11428.

18. Coppin, A., Dzierszinski, F., Legrand, S., Mortuaire, M., Fergurson, D. & Tomavo, S. (2003) Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Biochimie*. **85:** 353-361.

19. Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Dendouga, N., Popescu, O. & Tomavo, S. (2001) Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of Molecular Biology*. **39:** 1017-1027.

20. Yang, S. & Parmley, S. F. (1995) A bradyzoite stage-specifically expressed gene of *Toxoplasma gondii* encodes a polypeptide homologous to lactate-dehydrogenase. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **73:** 291-294.

21. Wan, K. L., Carruthers, V. B., Sibley, I. D. & Ajioka, J. W. (1997) Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* enconding the micronemal protein MIC2. *Molecular and Biochemical. Parasitology*. **84:** 203-214.

22. Luft, B. J. & Remington, J. S. (1988) Toxoplasmic encephalitis. *Journal of Infectious Diseases*. **157:** 1-6.

23. Frenkel, J. K. (1990) Transmission of toxoplasmosis and role of immunity in limiting transmission and illness. *Journal of American Veterinary Medical Association*. **196:** 233-240.

24. Remington, J. S. & Desmonts, G. (1990) Toxoplasmosis (pp. 89-195). En Remington, J. S. & Klein, J. O. (eds.) *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. The W. B. Saunders Co. Philadelphia, EE. UU.

25. Speer, C. A. (1998) *Foodborne and waterborne protozoan parasites*. En Doyle, M. P., Beuchat, L. R. & Montville (eds.). Food microbiology. Fundamentals and Frontiers. American Society of Microbiology. Washington, D. C., EE. UU.

26. Soete, M., Fortier, B., Camus, D. & Dubremetz, J. F. (1993) *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Experimental Parasitology*. **76:** 259-264.

27. Bohne, W., Heesemann, J. & Gross, U. (1994) Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infection and Immunity*. **62:** 1761-1767.

28. Kim, K. & Boothroyd, J. C. (1993) Stable transformation of the opportunistic pathogen *Toxoplasma* using chloramphenicol selection. *Clinical Research*. **41:** 209A.

29. Donald, R. G. & Roos, D. S. (1993) Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proceedings of the Royal National Academy of Sciences USA.* **90:** 11703-11707.

30. Saeij, J. P., Arrizabalaga, G. & Boothroyd, J. C. (2008) A cluster of four surface antigen genes specifically expressed in bradyzoites, SAG2 CDXY, plays an important role in *Toxoplasma gondii* persistance. *Infection and Immunity*. **76:** 2402-2410.

31. Hitziger, N. Dellacasa, I., Albiger, B. & Barragán, A. (2005) Dissemination of *Toxoplasma gondii* to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assesed by *in vivo* bioluminescence image. *Cell Microbiology*. **7:** 837-848.

32. Pepper, M., Dzierszinski, F., Crawford, A., Hunter, C. A. & Roos, D. (2004) Development of a system to study $CD4^{+}$-T-cell responses to transgenic ovalbuming-expressing *Toxoplasma gondii* during toxoplasmosis. *Infection and Immunology*. **72:** 7240-7246.

33. Saeji, J. P., Coller, S., Boyle, J. P., Jerome, M. E., White, M. W. & Boothroyd, J. C. (2007) *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature*. **445:** 324-327.

34. Shirafuji, H., Xuan, X., Kimata, I., Takashima, Y., Fukumoto, S., Otsuka, H., Nagasawa, H. & Suzuki, H. (2005) Expression of P23 of *Cryptosporidium parvum* in *Toxoplasma gondii* and evaluation of its protective effects. *Journal of Parasitology*. **91:** 476-479.

35. Sibley, L. D. & Boothroyd, J. C. (1992) Construction of a molecular caryotype for *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **51:** 291-300.

36. Khan, A., Bohme, U., Kelly, K. A., Adlem, E., Brooks, K., Simmonds, M., Mungall, K., Quail, M. A., Arrowsmith, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Harris, D., Collins, M., Fasker, N., Frasser, A., Hanze, Z., Jagels, K., Moule, S., Murphy, L., O´Neil, S., Rajandream, M. A., Saunders, D., Seeger, K., Whiteheas, S., Mayr, T., Xuan, X., Watanabe, J., Suzuki, Y., Wakaguri, H., Sugeno, S., Sugimoto, C., Paul-

sen, I., Mackey, A. J., Roos, D. S., Hall, N., Berriman, M., Barrell, B., Sibley, L. D. & Ajioka, J. W. (2006) Common inheritance of chromosome 1a associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. *Genome Research*. **16:** 1119-1125.

37. Gajria, B., Bahl, A., Brestelli, J., Dommer, J., Fischer, S., Gao, X., Heiges, M., Iodice, J., Kissinger, J. C., Mackey, A. J., Pinney, D. F., Roos, D. S., Stoeckert, Jr. C. J., Wang, H. & Brunk, B. P. (2008) ToxoDB: and integrated *Toxoplasma gondii* database resource. *Nucleic Acids Research*. **36:** D553-D556.

38. Sibley, L. D., LeBlanc, A. J., Pfefferkorn, E. R. & Boothroyd, J. C. (1992) Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics*. **132:** 1003-1015.

39. Saeij, J. P., Boyle, J. P., Coller, S., Taylor, S., Sibley, L. D., Brooke-Powell, E. T., Ajioka, J. W. & Boothroyd, J. C. (2006) Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science*. **314:** 1780-1783.

40. Blader, I. J., Manger, I. D. & Boothroyd, J. C. (2001) Microarray analysis reveals preciously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. *Journal of Biological Chemistry*. **276:** 24223-24231.

41. Knight, B. C., Kissane, S., Falciani, M., Salmon, M., Stanford, M. R. & Wallace, G. R. (2006) Expression analysis of immune response genes of Muller cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Neuroimmunology*. **179:** 126-131.

42. Fouts, A. E. & Boothroyd, J. C. (2007) Infection with *Toxoplasma gondii* bradyzoites has a diminished impact on host transcription relative to tachyzoite infection. *Infection and Immunity*. **75:** 634-642.

43. Fichera, M. E. & Roos, D. S. (1997) A plastic organelle as a drug target in apicomplexa parasites. *Nature*. **390:** 407-409.

44. Carruthers, V. B., Sherman, G. D. & Sibley, L. D. (2000) The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *Journal of Biological Chemistry*. **275:** 14346-14353.

45. Huynh, M. H., Rabeneau, K. E., Harper, J. M., Beatty, W. L. & Sibley, L. D. (2003) Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *EMBO Journal.* **22:** 2082-2090.

46. Huynh, M. H. & Carruthers, V. B. (2006) *Toxoplasma* MJC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLOS Pathogology*. 2. E84.

47. Jewet, T. J. & Sibley, L. D. (2003) Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Molecular Cell*. **11:** 885-894.

48. Meissner, M., Schluter, D. & Soldati, D. (2002) Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science*. **298:** 837-840.

49. Bradley, P. J., Ward, C., Cheng, S. J., Alexander, D. L., Coller, S., Coombs, G. H., Dunn, J. D., Ferguson, D. J., Sanderson, S. J., Wastling, J. M. & Boothroyd, J. C. (2005) Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*. **280:** 34245-34258.

50. Kasper, L. H., Crabb, J. H. & Pfefferkorn, E. R. (1983) Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *Journal of Immunology*. **130:** 2407-2412.

51. Burg, J. L., Peralman, D., Kasper, I. H., Ware, P. L. & Boothroyd, J. C. (1983) Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. **141:** 3584-3591.

52. Jung, C., Lee, C. Y. & Grigg, M. E. (2004) The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface protein. *International Journal for Parasitology*. **34:** 285-296.

53. Kim, S. K., Karasov, A. & Boothroyd, J. C. (2007) Bradyzoite-specific surface antigen SRS9 plays a role in maintaining *Toxoplasma gondii* persistence in the brain in host control of parasite replication in the intestine. *Infectious Immunology*. **75:** 1626-1634.

54. Nagel, S. D. & Boothroyd, J. C. (1989) The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *Journal of Biological Chemistry.* **264:** 5569-5574.

55. Rachinel, N., Buzoni-Gatel, D., Dutta, C., Mennechet, F. J., Luangsay, S., Minns, L. A., Griggs, M. E., Tomavo, S., Boothroyd, J. C. & Kasper, L. H. (2004) The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. **173:** 2725-2735.

56. Hakansson, S., Charron, A. J. & Sibley, L. D. (2001) *Toxoplasma* evacuoles: a two steps process of secretion and fusion forms the parasitophorms vacuole. *EMBO Journal*. **20:** 2132-2144.

57. Siani, A. P. & Boiner, K. A. (2001) The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorus vacuole membrane. *Journal of Cell Biology*. **154:** 95-108

58. El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrum, M., Wu, B., Galeotti, N., Fourmaux, M. N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G. & Dubremetz, J. F. (2006) The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modelling. *Proteomics*. **6:** 5773-5784.

59. Neudeck, A., Stachelhaus, S., Nischik, N., Striepen, B., Reichmann, G. & Fischer, H. G. (2002) Expression variance biochemical and immunological properties of *Toxoplama gondii* dense granule protein GRA7. *Microbes Infectivity*. **4:** 581-590.

60. Coopens, I., Dunn, J. D., Romano, J. D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J. C. & Joiner, K. A. (2006) *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell*. **125:** 261-274.

61. Gilbert, L. A., Ravindran, S., Turetzky, T. M., Boothroyd, J. C. & Bradley, P. J. (2007) *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryote Cell*. **6:** 73-83.

62. Saeij, J. P., Boyle, J. P., Grigg, M. E., Arrizabalaga, G. & Boothroyd, J. C. (2005b) Bioluminiscence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infectious Immunity*. **73:** 695-702.

63. El Hajj, H., Lebrum, M., Arold, L. T., Vial, H., Labesse, G. & Dubremetz, J. F. (2007) ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLOS Pathology*. 3, e14.

64. Seeber, F., Aliverti, A. & Zanetti, G. (2005) The plant-type ferredoxin-$NADP^+$-reductase/ferredoxin redox system is a possible drug target against apicomplexan human parasites. *Current Opinion in Pharmacology Research.* **11:** 3159-3172.

65. Crawford, M. J., Thomsen-Zieger, N., Ray, M., Schachtner, J., Roos, D. S. & Seeber, F. (2006) *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast. *EMBO Journal.* **25:** 3214-3222.

66. Water, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A. F., Besra, G. S., Roos, D. S. & McFadden, G. I. (1998) Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **95:** 12352-12357.

67. Camps, M., Arrizabalaga, G. & Boothroyd, J. C. (2002) An rRNA mutation identifies the apicoplast as the target for clindamycin in *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology*. **43:** 1309-1318.

68. Scanga, C. A., Alberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E. Y., Medzhitov, R. & Sher, A. (2002) Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *Journal of Immunology*. **168:** 5997-6001.

69. Mun, H. S., Aosai, F., Norose, K., Chen, M., Piao, L. X., Takeuchi, O., Akira, S., Ishikura, H. & Yano, A. (2003) TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *International Immunology*. **15:** 1081-1087.

70. Minns, I. A., Menard, L. C., Foureau, D. M., Darche, S., Ronet, C., Mielcarz, D. W., Buzoni-Gatel, D. & Kasper, L. H. (2006) TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. **176:** 7589-7597.

71. Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Sheran, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh S. & Sher, A. (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*. **308:** 1626-1629.

72. Aosai, F., Rodríguez Pena, M. S., Mun, H. S., Fang, H., Mitsunaga, T., Norose, K., Kang, H. K., Bae, Y. S. & Yano, A. (2006) *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 stimulates maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 4. *Cell Stress Chaperones*. **11:** 13-22.

73. Aliberti, J., Valenzuela, J. G., Carruthers, V. B., Hieny, S., Andersen, J., Charest, H., Reise Sousa, C., Fairlamb, A., Ribeiro, J. M. & Sher, A. (2003) Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Natural Immunology*. **4:** 485-490.

74. Omata, Y., Sethi, K. K. & Brandis, H. (1984) Analysis of the roles of immune interferon (IFN-gamma) and colony-stimulating factor(s) in the induction of macrophage anti-*Toxoplasma* activity. *Immunobiology*. **166:** 146-156.

75. Pfefferkorn, E. R. (1984) Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. **81:** 908-912.

76. Denkers, E. Y., Gazzinelli, R. T., Martin, D. & Sher, A. (1993) Emergence of $NK1.1^{+}$ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class 1-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*. **178:** 1465-1472.

77. Khan, I. A., Matsuura, T. & Kasper, L. H. (1994) Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infectious Immunology*. **75:** 1626-1634.

78. Lecardier, L., Moleon-Borodowsky, I., Dubremetz, J. F., Tourvieille, B., Mercier, C., Deslee, D., Capron, A. & Cesbron-Delauw, M. F. (1995) Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorus vacuole. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **70:** 85-94.

79. Brown, C. R., David, C. S., Khare, S. J. & McLeod, R. (1994) Effects of human clase I transgenes on *Toxoplasma gondii* cyst formation. *Journal of Immunology*. **152:** 4537-4541.

80. Blanchard, N., Gonzlez, F., Schaeffer, M., Joncker, N. T., Cheng, T., Shastri, A. J., Robey, E. A. & Shastri, N. (2008) Immunodominant protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Natural Immunology*. **9:** 937-944.

81. Payne, T. M., Molestina, R. E. & Sinai, A. P. (2003) Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappa B function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *Journal of Cell Science*. **116:** 146-156.

82. Kim, J. M., Oh, Y. K., Kim, Y. J., Cho, S. J., Ahn, M. H. & Cho, Y. J. (2001) Nuclear factor-kappa B plays a major role in the regulation of chemokine expression of HeLa cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Parasitology Research*. **87:** 758-763.

83. Butcher, B. A., Kim, L., Johnson, P. F. & Denkers, E. Y. (2001) *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear traslocation of the transcription factor NF-kappa B. *Journal of Clinical Microbiology*. **167:** 2193-2201.

84. Grover, C. M., Thulliez, P., Remington, J. S. & Boothroyd, J. C. (1990) Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. **28:** 2297-2301.

85. Fuentes, I., Rubio, J. M., Ramirez, C. & Alvar, J. (2001) Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. **39:** 1566-1570.

86. Roberts, A., Hedman, K., Luyasu, V., Zufferey, J., Bessieres, M. H., Blatz, R. M., Canolfi, E., Dicoster, A., Enders, G., Gross, U., Guy, E., Hayde, M., Ho-Yen, D., Johnson, J., Lecolier, B., Naessens, A., Pelloux, A., Thulliez, P. & Petersen, E. (2001) Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **20:** 467-474.

87. Kong, J. T., Grigg, M. E., Uyetake, L., Parmley, S. & Boothroyd, J. C. (2003) Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *Journal Infectious Diseases*. **187:** 1484-1495.

88. Peyron, F., Lobry, J. R., Musset, K., Ferrándiz, J., Gómez-Marín, J. E., Petersen, E., Meroni, V., Rausher, B., Mercier, C., Picot, S. & Cesbron-Delauw, M. F. (2006) Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe ant types I and III in Colombia (South America). *Microbes and Infection*. **8:** 2333-2340.

89. Zangerle, R. & Allerberger, F. (1991) Effect of prophylaxys against Penumocystis carini on *Toxoplasma* encephalitis; (letter, comment). *Lancet*. **337:** 1232.

90. Kovacs, J. A. (1992) Efficacy of atovaquone in treatment of toxoplasmosis in patientes with AIDS. The NIAID-Clinical Center Intramural AIDS Program. *Lancet*. **340:** 637-638.

91. McFadden, D. C., Tomavo, S., Berry, E. A. & Boothroyd, J. C. (2000) Characterization of cytochrome *b* from *Toxoplasma gondii* and Q(o) domain mutations as a mechanism of atavaquone-resistance. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **108:** 1-12.

92. Srivastava, I. K., Morrisey, J. M., Darrouzet, E., Daldal, F. & Vaidya, A. B. (1999) Resistance mutations reveal the atavaquone-binding domain of cytochrome *b* in malaria parasites. *Molecular Microbiology*. **33:** 704-711.

93. Laissy, J. P., Soyer, P., Tebboune, J., Gay-Depassier, P., Casalino, E., Lariven, S., Sibert, A. & Menu, Y. (1994) Contrast-enhanced fast MRI in differentiating brain toxoplasmosis and lymphoma in AIDS patients. *Journal of Computer Assisted Tomography*. **18:** 714-718.

94. Pfefferkorn, E. R., Nothnagel, R. F. & Borotz, S. E. (1992) Parasiticidal effect of clindamycin on *Toxoplasma gondii* grown in cultured cells and selection of a drug-resistant mutant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **36:** 1091-1096.

95. Buxton, D., Thompson, K., Maley, S., Wright, S. & Bos, H. J. (1991) Vaccination of sheep with immunity to challenge when pregnant. *Veterinary Record*. **129:** 89-93.

96. Waldeland, H., Pfefferkorn, E. R. & Frenkel, J. K. (1983) Temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii* pathogenicity and persistence in mice. *Journal of Parasitology*. **69:** 171-175.

97. McLeod, R., Frenkel, J. K., Estes, R. G., Mack, D. G., Eisenhauer, P. B. & Gibson, G. (1988) Subcutaneus and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasmal challenge. *Journal of Immunology*. **140:** 1632-1637.

98. Fox, B. A. & Bzik, D. J. (2002) De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. *Nature*. **415:** 926-929.

99. Webster, J. P., Brunton, C. F. & MacDonald, D. W. (1994) Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild born rats (*Rattus norvergicus*). *Parasitology.* **109:** 37-43.

100. Berdoy, M., Webster, J. P. & MacDonald, D. W. (2000) Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of Biological Science*. **267:** 1591-1594.

101. Vyas, A., Kim, S. K., Giacomini, N., Boothroyd, J. C. & Sapolsky, R. M. (2007) Behavioral changes induced by *Toxoplasma infection* of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of USA*. **104:** 6442-6447.

102. Flegr, J., Havicek, K., Kodym, P., Maly, M. & Smahel, Z. (2002) Increased risk of traffic accidents in subjects with latent-toxoplasmosis: a retrospective case-control study. *BMC Infectious Diseases*. 2: 11 (Citado por Boothroyd, J. C. (16)).

103. Derouin, F., Thulliez, P. & Romand, S. (2002) Schizophrenia and serological methods for diagnosis of toxoplasmosis. *Clinical Infectious Diseases*. **34:** 127-129.

104. Dubey, J. P. & Beattie, C. P. (1988) *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. EE.UU.

105. Fenkel, J. K. (1970) *T. gondii* fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. **167:** 517-521.

106. Murrel, K. D. (1995) Foodborne parasites. *International Journal of Environmental Health Research*. **5:** 63-85.

107. Dubey, J. P. (1993) *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis* and other cysts-forming coccidian of humans and animals. En *Parasitic Protozoa* (Dubley, J. P., ed.). Vol. 6, págs. 1-158. Academic Press. New York.

108. Henderson, J. B., Beattie, C. P., Hale, E. G. & Wright, T. (1984) The evaluation of new services: possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. *International Journal of Epidemiology.* **13:** 66-72.

109. Frenkel, J. K. & Ruíz, Z. (1981) Endimicity of toxoplasmosis in Costa Rica. Transmission between cats, soil, intermediate hosts and humans. *American Journal of Epidemiology*. **113:** 254-269.

110. Gordon, N. (1993) Toxoplasmosis: a preventable cause of brain damage. *Developmental Medicine & Child Neurology*. **35:** 567-573.

111. Hutchinson, W. M. (1970) Coccidian-like nature of *T. gondii*. *British Medical Journal*. **1:** 142-144.

112. Dubey, J. P. & Kirkbride, C. A. (1989) Enzootic toxoplasmosis in sheep in North-Central United States. *Journal of Parasitology*. **75:** 673-676.

113. Dubey, J. P., Kotula, A. W., Skarar, A. K., Andrews, C. D. & Lindsay, D. S. (1990) Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* cysts in pork. *Journal of Parasitology*. **76:** 201-204.

114. Kotula, A. W., Dubey, J. P., Skarar, A. K., Andrews, C. D., Shen, S. K. & Lindsay, D. S. (1991) Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* cysts in pork. *Journal of Food Protection*. **54:** 687-690.

9. Diseño higiénico del equipo de procesado de alimentos

ERNESTO CASTAÑEDA MARTÍN

Catedrático de Ingeniería Química. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Telecomunicación. Universidad Politécnica de Madrid.
Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

1. INTRODUCCIÓN

Excepción hecha de las pequeñas fábricas de tipo artesanal, hoy en día, la producción y transformación de alimentos se lleva a cabo, mayoritariamente, en grandes fábricas, con procesos continuos de producción, en los que la economía de escala influye marcadamente en el precio final de los productos, permitiendo un consumo por sectores cada vez más amplios de la población. De ahí la importancia que adquiere el diseño del equipo de procesado, valorándose, lógicamente, su fiabilidad, su rendimiento y su coste. No obstante, resulta evidente que, en un futuro muy próximo, la lucha por hacerse con el mercado redundará en una más cuidada calidad sanitaria y organoléptica y ahí aparece el concepto de higiene, pues resulta esencial para conseguir alimentos inocuos y de buena calidad.

Entonces, ¿qué se entiende por equipo higiénicamente diseñado? Shore y Jowitt (1) lo postulaban así:

La producción de una fábrica que permanezca limpia durante el trabajo o que permita alcanzar el grado de limpieza deseado con el mínimo esfuerzo.

Desde esta perspectiva, la concepción higiénica de los equipos presenta una triple finalidad (2): limitar la contaminación microbiana, mejorar la limpieza, la desinfección y el enjuagado y, finalmente favorecer la conservación y el mantenimiento. La concepción higiénica debe estar basada, por tanto, en la combinación de exigencias mecánicas, de tecnología de alimentos y de microbiología.

La higiene pasa a ser considerada como una fase más del proceso productivo, estableciéndose unos métodos que deben ser eficaces para que la repercusión económica del proceso sobre el producto final sea óptima (3).

Ésta es la tendencia que se está implantando en las industrias alimentarias, donde en vez de analizar el producto acabado se controla el conjunto de procesos que intervienen en la elaboración. A este sistema se le conoce con el nombre de "Análisis de Riesgo y Control de Puntos Críticos" (ARICPC) en el que una de las principales ocupaciones a considerar es el correcto desarrollo de las labores de limpieza y desinfección (4).

2. LEGISLACIÓN

La Directiva 93/43/CEE, relativa a la higiene de los alimentos, define el conjunto de buenas prácticas de higiene, destacando en nuestro caso el Capítulo V del Anexo, denominado "Requisitos del equipo", en el que establece:

Todos los artículos, instalaciones y equipos que entren en contacto con los productos alimenticios deberán estar limpios y:

a) Su construcción, composición y estado de conservación y mantenimiento deberán reducir al mínimo el riesgo de contaminación de los productos alimenticios.

b) A excepción de recipientes y envases no reemplazables, su construcción, composición y estado de conservación y mantenimiento deberán permitir que se limpien perfectamente y, cuando sea necesario, que se desinfecte en la medida necesaria para los fines perseguidos.

c) Su instalación permitirá la limpieza adecuada de la zona circundante.

Por otra parte, la Directiva 89/392/CEE, relativa a las máquinas, impone numerosas exigencias en función de riesgos mecánicos, eléctricos, etc., debidos al ruido, así como exigencias específicas para los equipos destinados a la preparación y tratamiento de alimentos. Sin embargo, esta normativa ha sido modificada parcialmente por la Directiva 2006/42/CE, que ha entrado en vigor el 19 de diciembre de 2009, y que en su apartado 2.1. MÁQUINAS DESTINADAS A LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS, COSMÉTICOS O FARMACÉUTICOS, establece:

Las máquinas previstas para ser utilizadas con productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos se deben diseñar y fabricar de forma que se eviten los riesgos de infección, enfermedad o contagio.

Deben observarse los siguientes requisitos:

a) Los materiales que entren o puedan entrar en contacto con los productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos deberán cumplir con las directivas que les sean aplicables. La máquina se debe diseñar y fabricar de tal modo que dichos materiales puedan limpiarse antes de cada utilización; cuando esto no sea posible, se utilizarán elementos desechables.

b) Todas las superficies en contacto con los productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos que no sean superficies de elementos desechables:

   — serán lisas y no tendrán ni rugosidades ni cavidades que puedan albergar materias orgánicas. Se aplicará el mismo principio a las uniones entre dos superficies;

   — se deben diseñar y fabricar de manera que se reduzcan al máximo los salientes, los rebordes y los repliegues de los ensamblajes;

   — deberán poder limpiarse y desinfectarse fácilmente cuando sea necesario, previa retirada de aquellas partes que sean fácilmente desmontables. Las superficies internas estarán empalmadas por cavetos de radio suficiente para posibilitar una limpieza completa;

c) Los líquidos, gases y aerosoles procedentes de los productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos y de los productos de limpieza, desinfección o aclarado habrán de poder ser completamente desalojados de la máquina (si es posible, en una posición de limpieza).

d) La máquina se debe diseñar y fabricar de manera que se pueda evitar toda infiltración de sustancias, toda acumulación de materias orgánicas o penetración de seres vivos y, en particular, de insectos, en las zonas que no puedan limpiarse.

e) La máquina se debe diseñar y fabricar de manera que los productos auxiliares que representen un peligro para la salud, incluidos los lubricantes utilizados, no puedan entrar en contacto con los productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos. En su caso, la maquinaria se debe diseñar y fabricar de manera que pueda comprobarse el cumplimiento permanente de esta condición.

En el manual de instrucciones de las máquinas previstas para ser utilizadas con productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos, se indicarán los productos y métodos de limpieza, desinfección y aclarado aconsejados, no sólo para

las partes fácilmente accesibles, sino también para las partes cuyo acceso fuera imposible o estuviera desaconsejado.

Para cumplir con estas exigencias, además de adecuar las instalaciones, la empresa debería establecer un plan de limpieza y desinfección por escrito y establecer un control del nivel de efectividad de dicho plan (5).

3. MATERIALES

Tal como se ha recogido en el apartado anterior y de conformidad con la Directiva 89/109/CEE, "Todos los materiales en contacto con los alimentos deben ser no tóxicos, mecánicamente estables, no absorbentes, inertes y resistentes a los productos alimentarios y a todos los agentes de limpieza y desinfección, a las diferentes concentraciones y a las diferentes presiones y temperaturas de utilización". Además, las superficies en contacto con los alimentos serán lisas, duras, continuas y carentes de oquedades, fisuras y grietas. Cuanto más lisa sea la superficie más fácil será su limpieza, de aquí que para su obtención se prefiera el método del electropulimentado al pulimentado mecánico (6).

Las superficies que habitualmente no entran en contacto con los alimentos también deber ser lisas, fácilmente lavables y no experimentar corrosión. Así, el pintado y demás tratamientos superficiales de la maquinaria debe limitarse a las superficies que no contactan con los alimentos.

Teniendo en cuenta todas estas condiciones, resulta lógico que sean, realmente pocos, los materiales disponibles. A continuación se describen los más utilizados.

3.1. Aceros inoxidables

Se emplean por su excelente resistencia a la corrosión. Contienen, al menos, un 12% de Cr, lo que permite la formación de una delgada capa protectora de óxido de cromo cuando el acero se expone al oxígeno. Además, se pueden limpiar y desinfectar fácilmente. Por todo ello resultan el material más utilizado en la industria alimentaria.

Hay cuatro tipos de aceros inoxidables, según la estructura cristalina y el mecanismo de endurecimiento: ferrítico, martensítico, austenítico y endurecido por precipitación. Los más empleados son los austeníticos 18/8 al cromo-

níquel, con adición de molibdeno o sin ella, según el fin al que vayan destinados. Así, estos aceros son resistentes al ataque de los detergentes enérgicos actualmente empleados y aunque su resistencia a los iones cloruro en dilución acuosa es limitada, resisten sin embargo a las disoluciones desinfectantes de hipoclorito en forma de disolución alcalina (pH 8-9), con 3-15% de cloro activo. Además poseen una excelente ductilidad, conformabilidad y resistencia a la corrosión. Presentan magnífica resistencia al impacto a bajas temperaturas, al no tener temperatura de transición frágil-dúctil y no son ferromagnéticos (7). En la Tabla 1 aparece recogida la composición química de los aceros inoxidables de grado 300, según la norma AISI, más usados por sus características tecnológicas y su precio.

El AISI 304 es resistente a la corrosión originada por la mayoría de alimentos y agentes de limpieza, no da coloraciones, es fácil de limpiar y relativamente barato. Sin embargo es sensible al SO_2, por lo que su empleo en la industria vitivinícola sólo es aconsejable para vinos y mostos con bajo contenido en sulfuroso. Para valores superiores a los 70 mg/l de SO_2 es preferible utilizar el AISI 316.

Así mismo, cuando se prevean problemas de corrosión más acusados, como en el caso de salmueras y alimentos muy ácidos (vinagre) debe emplearse el AISI 316, dados su mayor contenido en níquel y, sobre todo, el 2-3% de molibdeno presente. Lo mismo ocurre en la industria confitera, donde las disolu-

Tabla 1. *Composición química de los aceros inoxidables.*

Componente	**Norma AISI**			
	304	304L	316	316L
Carbono (max)	0,08	0,03	0,08	0,03
Cromo	18-20	18-20	16-18	16-18
Níquel	8-12	8-12	10-14	10-14
Molibdeno	—	—	2-3	2-3
Manganeso (max)	2	2	2	2
Fósforo (max)	0,045	0,045	0,045	0,045
Azufre (max)	0,030	0,030	0,030	0,030
Silicio (max)	1	1	1	1

Las cantidades se expresan en % del elemento.

ciones de glucosa y ácido cítrico, con presencia de iones cloruro y temperaturas de hasta 100 ºC, podrían generar problemas de corrosión.

Por otra parte, en aquellas aplicaciones que se requiera soldar, son recomendables los aceros con bajo contenido en carbono (AISI 304L y 316L) para reducir los riesgos de corrosión intergranular. En ningún caso deben pulirse los cordones de soldadura con abrasivos que contengan hierro, ya que se puede provocar la aparición de manchas de herrumbre (2).

3.2. Aluminio y sus aleaciones

Se utiliza bien sea solo o en aleaciones con un alto contenido de aluminio (superior al 99%). En este sentido podrían destacarse las siguientes:

- Aleaciones 1100-0 y 1100-H18, aleaciones para forja, no tratables térmicamente, con un contenido de aluminio superior al 99% y utilizables tanto en el procesamiento de alimentos como en la fabricación de bebidas.
- Aleaciones 5182-0 y 5182-H19, también para forja con un contenido de Mg del 4,5% y útiles para tapas de latas de bebida.
- Aleación 443-F, aleación para moldeo, con 5,2% de Si, utilizable para fabricación de equipos destinados al manejo de alimentos.

El aluminio es un metal muy ligero (el segundo, después del magnesio) y muy buen conductor eléctrico y térmico. Presenta, además, una excelente resistencia a la corrosión ya que reacciona con el oxígeno para formar una capa muy delgada de óxido de aluminio, reforzable por medios físicos y químicos, que le protege de los medios corrosivos. Además responde fácilmente a los mecanismos de endurecimiento; en este sentido, las aleaciones suelen ser mucho más resistentes que el aluminio puro.

Por contra, el aluminio tiene un bajo módulo de elasticidad y un bajo límite de fatiga, además de que su utilización a alta temperatura es muy limitada, dado su bajo punto de fusión. Así mismo las aleaciones de aluminio tienen pequeña resistencia al desgaste, consecuencia de su baja dureza.

Con estas características, el aluminio se utiliza en barquetas, bandejas, utensilios de cocina, recipientes, etc. Las mejores características mecánicas de sus aleaciones amplían su uso en depósitos, calderas, moldes, aparatos a presión, botes de bebida, etc.

3.3. Cobre y sus aleaciones

En líneas generales, es un pésimo material de construcción de equipos para la industria alimentaria, dada su toxicidad. Por ello, su uso está prohibido salvo en chocolatería, confitería sin ácidos y destilería, donde se emplea el llamado cobre alimentario que es una aleación perteneciente a la clase de cobres desoxidados. En cualquier caso, si se emplearan en el equipo de procesado de alimentos recipientes de cobre o de latón, deberían protegerse, por ejemplo, cubriéndolos con una capa de estaño.

3.4. Aleaciones de níquel y cobalto

Se utilizan para protección contra la corrosión y para lograr resistencia a altas temperaturas, aprovechando que sus puntos de ebullición y sus resistencias son altos. Es por ello que se emplean en la cocción de alimentos: marmitas, serpentines, …, máxime si se considera su buena conductividad térmica.

3.5. Materiales poliméricos

Los polímeros presentan una serie de propiedades muy interesantes, como son baja densidad, amplio rango de utilización como posibles materiales, gran libertad de elección, baja energía de transformación y obtención, importante eficacia de coste e incluso relativa resistencia a la corrosión, que explican su amplia difusión en diversos mercados y tecnologías, en muchos casos sustituyendo a los metales y aleaciones metálicas (8). No obstante, las propiedades generales de los polímeros varían mucho, en función de la materia prima utilizada, de los aditivos incorporados y del procedimiento de fabricación.

En cualquier caso, los materiales empleados en la industria alimentaria deber ser inocuos y no deben transmitir a los alimentos propiedades nocivas ni cambiar sus características organolépticas.

Los polímeros termoplásticos utilizados en alimentación son, por lo general, resistentes a los ácidos, álcalis y agentes de limpieza; pueden soportar grandes variaciones de temperatura, aunque eso sí, incorporándoles los termoestabilizantes precisos y pueden resistir la absorción acuosa. Los más empleados son las poliolefinas (polietileno, polipropileno,…), los polímeros de flourocarbono (teflón), acrílicos, vinílicos e incluso el policarbonato y el nylon. Entre sus po-

sibles aplicaciones pueden citarse la construcción de tanques, tuberías, accesorios, cintas transportadoras y planchas de picado.

Los termoestables utilizados en la construcción de equipos alimentarios, suelen pertenecer a las familias de los poliésteres, los poliuretanos y las resinas epoxídicas. El intervalo de temperaturas de uso es más amplio que en el caso de los termoplásticos, pero son más sensibles a ácidos y álcalis.

Por último, los elastómeros o cauchos suelen emplearse para cierres, juntas, tuberías y cintas transportadoras. El más utilizado es el caucho natural (cis-1,4 poliisopreno), si bien también se emplean otros cauchos sintéticos como el neopreno o los de butadieno-estireno.

3.6. Materiales no aconsejables

Se consideran materiales que han sido ampliamente utilizados, pero que las actuales normas higiénico-sanitarias les convierten en materiales poco recomendables. Así:

El acero galvanizado fue muy utilizado en la industria alimentaria, sin embargo su utilización actual queda restringida a las conducciones de agua fría de proceso (pH = 7) (2).

Se debe evitar, también, el uso del plomo en soldaduras y el del cadmio y antimonio en la construcción de equipos en contacto con los alimentos.

Así mismo, el carácter inerte de los materiales en contacto con los alimentos, desaconseja el empleo de polímeros termoestables con grupos fenol y formaldehído. Tampoco la madera (y otros materiales absorbentes) debe ser utilizada, salvo en el caso de las cubas de fermentación.

4. PRINCIPIOS GENERALES DEL DISEÑO HIGIÉNICO

4.1. Ausencia de depósitos

Se refiere a la no acumulación de alimentos en depósitos u otras zonas muertas en los que pueda generarse un crecimiento bacteriano. Por ello, las superficies en contacto con el alimento deben ser no porosas, lisas y pulidas. En principio, la rugosidad de las superficies en contacto con los alimentos debe ser Ra = 0,8 μm (2). Pueden aceptarse rugosidades mayores siempre que estén clara-

mente especificadas, dando por supuesto que los tiempos de limpieza deben aumentarse. Así mismo, debe indicarse que en la industria de bebidas se admiten rugosidades de hasta Ra = 1,6 μm.

Por otra parte, hay que evitar los ángulos, grietas y cortes mediante la curvatura adecuada que evite la acumulación del alimento y facilite la limpieza. Además, las soldaduras que se realicen serán continuas y lisas y se evitarán los finales muertos y los tubos en T. Por último, no debe permitirse la utilización de tornillos en las zonas en contacto con los alimentos pues propician su acumulación. Si por alguna razón extraordinaria se requiriera algún tipo de tornillo, su cabeza será semiesférica y se situará en el lado que contacta con el alimento (9).

4.2. Facilidad de desmantelamiento y montaje

Se pretende que el diseño permita un fácil desmantelamiento de las partes principales, para una limpieza, en tiempos relativamente cortos, seguida del nuevo montaje del equipo. Por ello, el número de piezas de trabajo del equipo de procesado debe ser el menor posible. Así mismo, para facilitar la limpieza, se utilizarán sistemas fáciles de soltar, como por ejemplo palomillas y tornillos de paso de rosca ancho o también abrazaderas y muelles de unión.

4.3. Accesibilidad

Las superficies y componentes de la maquinaria de elaboración de alimentos deben ser fácilmente accesibles para su inspección, de forma que al ser sometidos a los procedimientos establecidos de limpieza y desinfección se consiga un resultado adecuado. En este sentido, si el sistema de limpieza es automático, su eficacia debe ser similar al sistema manual.

Las separaciones entre máquinas, o de éstas con las paredes deberán ser como mínimo de 45 cm. Además, el equipo se situará a una distancia del suelo de, al menos, 20 cm. Todo ello con vistas a facilitar la limpieza, inspección y mantenimiento.

Las grandes plantas de procesado de alimentos, caso de los túneles de deshidratación y de enfriamiento por aire, tendrán puertas que faciliten el acceso para la limpieza y mantenimiento (diámetro mínimo: 60 cm).

4.4. Drenaje

El diseño del equipo en contacto con los alimentos tiene que ser de tal forma que facilite el drenado total, no sólo de los alimentos, sino también de los productos o agentes de limpieza, al objeto de evitar zonas de acumulación que generarían el correspondiente peligro sanitario.

Por ello, los sistemas de drenaje se diseñarán de forma que eviten salpicaduras, se puedan limpiar fácilmente y dispongan de la inclinación adecuada para posibilitar la salida de efluentes.

4.5. Superficies exteriores

Estas superficies tienen la función primordial de protección por lo que, como siempre, su diseño evitará la acumulación de suciedad y facilitará la limpieza.

En líneas generales, al diseñar el equipo hay que separar los mecanismos tales como grupo motor, reductor, transmisor, …, siempre más difíciles de limpiar en todos los sentidos, de las zonas en las que se exige una limpieza estricta. Sin embargo y, a pesar de lo anterior, los motores estarán protegidos por una carcasa estanca y no oxidable, con el adecuado acabado superficial, dejando el espacio suficiente entre la bancada y el motor para facilitar la limpieza. Además, las transmisiones de potencia deben solucionarse de forma que se evite la contaminación del alimento.

5. PRINCIPALES OPERACIONES DE PROCESADO DE ALIMENTOS Y EQUIPOS EMPLEADOS (10)

5.1. Operaciones con sólidos

El término “sólido” en la industria alimentaria puede aplicarse al alimento propiamente dicho (carne, pescado, etc.) o bien representar la materia prima para su obtención (caña de azúcar). Desde esta perspectiva, las principales operaciones con sólidos son el tamizado y la reducción de tamaño.

5.1.1. Tamizado

Es la operación más utilizada para la clasificación de alimentos por tamaños (que tanto suele influir en el precio final del producto) y para la caracteri-

zación de productos granulares y purulentos. Un tamiz no es más que una malla o superficie sólida perforada, con orificios de tamaño uniforme. Su utilización suele tener diferentes fines:

a) Limpieza de alimentos o de materias primas. Para ello se emplean tamices rotatorios consistentes en un tambor giratorio perforado, ligeramente inclinado, al que se alimenta por un extremo obteniéndose en el otro extremo el alimento limpio, si las impurezas son de menor tamaño que el producto, o las propias impurezas si ocurre al revés.

b) Clasificación de alimentos por tamaño. Se pretende la separación de una mezcla de partículas sólidas, en un número pequeño de fracciones de tamaño más homogéneo que la mezcla original. Para conseguirlo se emplean tanto tamices de fondo plano (alimentos duros como el azúcar) como tamices rotatorios (alimentos menos duros como los garbanzos).

c) Análisis por tamizado de productos granulados o pulverulentos. Tiene por objeto obtener información sobre la distribución de tamaños, superficie específica, etc., en mezclas heterogéneas de partículas sólidas. Se utilizan tamices normalizados, fabricados con tela de alambre, apilados, situando el de abertura más pequeña en el fondo y el de mayor abertura en la parte superior.

5.1.2. Reducción de tamaño de sólidos

Con ello se pretende aumentar la superficie específica de los alimentos, lo que reduce los tiempos de procesado, por ejemplo el secado, el horneado, etc. Así mismo, al disminuir el tamaño de las partículas, se facilita la mezcla con otros materiales y se aumenta el grado de homogenización de dicha mezcla e incluso, a veces, se adecúa así el producto a la demanda del consumidor. Los aparatos más utilizados son:

a) Molinos. Reducen los materiales desde tamaños intermedios hasta tamaños finos, del orden de 40 mallas. Según los elementos constitutivos, hay varios tipos:

   — Molinos de martillos, constituidos por un disco giratorio, situado en el interior de la carcasa, que soporta varios martillos móviles ubicados en su periferia.

   — Molinos de cuchillos, similares a los anteriores pero con cuchillos cortantes en lugar de martillos.

— Molinos de discos giratorios, basados en fuerzas de frotamiento, por lo que se producen partículas muy finas.

— Molinos de bolas, formados por un cilindro giratorio horizontal, en cuyo interior se sitúan bolas de acero inoxidable o cerámicas.

— Molinos de barras, empleados en la molienda de materiales untuosos, son análogos a los anteriores, sustituyendo las bolas por barras cilíndricas de longitud igual a la del cilindro.

b) Molinos de ultrafinos. Las partículas de la alimentación no deben tener un tamaño superior a 6 mm y dan lugar a productos de tamaños comprendidos entre 1 y 50 μm. Suelen utilizar la energía de un fluido (aire, vapor de agua, …) para conseguir la reducción de tamaño. La rotura de las partículas se produce tanto por el rozamiento entre ellas como por el rozamiento con las paredes del equipo.

c) Cortadoras. Se utilizan cuando se requiere que los productos resultantes sean partículas sólidas, con formas específicas y tamaño uniforme (dados, gajos, etc.), con longitudes comprendidas, por lo general, entre 2 y 40 mm. Existe una gran variedad de máquinas cortadoras, en función de los materiales y de la forma a dar al producto.

5.2. Agitación y mezcla de líquidos

La agitación se refiere al movimiento inducido a un fluido contenido en un recipiente, mientras que la mezcla es la operación en la que se combinan dos o más componentes para uniformar su composición y propiedades. Estas operaciones son muy frecuentes en la industria alimentaria. Así por ejemplo, se pueden conseguir determinadas propiedades funcionales o características organolépticas, combinando distintos ingredientes.

Se comentará, en primer lugar, la agitación y mezcla de líquidos miscibles, tratando a continuación la de los líquidos inmiscibles para formar una emulsión.

5.2.1. Agitación de líquidos miscibles

El equipo consta básicamente del tanque o recipiente donde se realiza la operación y el elemento de agitación propiamente dicho. Por lo general, los líquidos se agitan en tanques de forma cilíndrica, provistos de un agitador en po-

sición vertical. El tanque puede estar abierto o cerrado en la parte superior y el fondo suele ser redondeado, nunca plano, para evitar la acumulación de restos, evitar los espacios muertos y así propiciar la circulación de las corrientes de fluido. Además la altura del líquido en el tanque suele ser del mismo orden que el diámetro. Si se utilizan tanques de mayor profundidad hay que incorporar más elementos de agitación para homogeneizar el proceso. En cualquier caso, los agitadores constituyen un elemento clave del proceso, existiendo varios tipos según la viscosidad del medio:

a) Agitación de líquidos de viscosidad media o baja (inferior a 50 Pa s).
   - — Agitadores de hélice, en los que el rodete está constituido por una hélice de dos, tres o hasta cuatro palas. Suelen girar a velocidades elevadas, por lo que originan una gran turbulencia en los alrededores del rodete.
   - — Agitadores de turbina, formados por una serie de aspas o palas cortas unidas a un eje vertical o a un disco central fijado al eje rotatorio. Cerca del rodete se forma una gran turbulencia así como una intensa cizalladura, razón por la que son muy útiles para la premezcla de embutidos.
   - — Agitadores de pala, consisten, por lo general, en una hoja plana sujeta a un eje rotatorio vertical, si bien también son frecuentes los de dos y cuatro palas. Producen una acción de mezcla suave, por lo que son adecuados para mezclas sencillas.

b) Agitación de líquidos de elevada viscosidad (50-1.000 Pa s). Se emplean agitadores con baja velocidad de giro y con un diámetro de rodete análogo al del tanque.
   - — Agitadores de ancla, poseen una capacidad de mezcla pequeña y el nivel de turbulencia que generan es bajo. Son útiles para evitar la acumulación de partículas sólidas sobre las paredes del recipiente.
   - — Agitadores helicoloidales, muy indicados para la homogeneización de líquidos de elevada viscosidad; existen en diferentes versiones: doble hélice, tornillo helicoidal, cinta helicoidal con tornillo, …

5.2.2. Emulsificación y homogeneización de líquidos

La emulsificación es la operación unitaria que pretende conseguir la mezcla estable de dos o más líquidos no miscibles, de forma que uno de ellos lla-

mado fase dispersa, se dispersa en forma de pequeñas gotas (1-10 μm) en el otro, que constituye la fase continua.

La homogeneización tiene por objeto conseguir que las emulsiones ya preparadas aumenten su estabilidad, reduciendo el tamaño de las gotas mediante la aplicación de grandes fuerzas de cizalla. Las dos operaciones se utilizan en el sector alimentario para modificar las propiedades funcionales o la comestibilidad de los alimentos y no afectan ni al valor nutritivo ni a la vida útil de los alimentos.

La emulsión tiene como característica principal el pequeño tamaño de las gotas de la fase dispersa, lo que se consigue por la aplicación de las grandes fuerzas de cizalla, que deforman y rompen las gotas en otras más pequeñas y mejor dispersas. La incorporación de una agente emulsificante adecuado, puede propiciar la formación de una película, situada en la interfase (fase polar-fase no polar), que estabilizará la emulsión.

Para la realización de estas operaciones, los equipos más utilizados en la industria alimentaria son:

a) Mezcladores a gran velocidad.

   Pueden ser tipo turbina o hélice, como en la mezcla de líquidos miscibles, y se utilizan para la premezcla de líquidos de baja viscosidad. Así se preparan, por ejemplo, margarinas, mayonesas y quesos elaborados.

b) Homogeneizadores a presión.

   Formados en esencia por una bomba de alta presión y una válvula de homogeneización, a través de la cual se bombea el líquido a presiones del orden de 70.10^3 KPa. Estos homogeneizadores se emplean en la elaboración de salsas y helados, así como en la fase previa a la esterilización y pasteurización de la leche a temperaturas ultraaltas.

c) Molinos coloidales.

   Están formados por una superficie estacionaria y otra rotatoria, quedando entre ellas una pequeña separación (50-150 μm). La velocidad del rotor oscila entre 3.000 y 15.000 rpm. Estos molinos son muy útiles para manipular productos de alta viscosidad (mantequilla de cacahuete, carne, etc.), mientras que para las bajas viscosidades son más eficientes los homogeneizadores a presión.

d) Homogeneizadores ultrasónicos.

   Las ondas ultrasónicas de alta frecuencia (18-30 KHz) se producen por medio de una lámina de metal situada enfrente de una boquilla que bom-

bea el líquido a altas presiones (300-1.300 KN/m^2). El chorro que sale, al chocar con la arista de la hoja la hace vibrar, induciendo ondas de frecuencia ultrasónica al líquido. Estas ondas ultrasónicas producen ciclos alternantes de expansión y comprensión en líquidos de baja viscosidad, consiguiéndose así la dispersión de un líquido inmiscible en otro. Estos homogeneizadores son muy empleados actualmente: mezclas de helados, sopas de crema, chocolate para revestimientos, alimentos infantiles, aderezos para ensaladas, etc.

5.3. Mezclado de sólidos y pastas

Es una de las operaciones más frecuentes en la industria alimentaria e implica, al igual que el mezclado de líquidos, las interposición de dos o más componentes separados para formar un producto lo más uniforme posible. Sin embargo, a diferencia del mezclado de líquidos, no se producen corrientes de flujo que transporten el material no mezclado hasta la zona del agitador, por lo que el producto resultante puede diferir en su composición a lo largo de la masa, aunque el mezclado estuviera bien hecho.

A efectos de la exposición, se distinguirá entre el mezclado de sólidos pulverizados y granulados y el mezclado de pastas.

5.3.1. Mezclado de sólidos

Puede producirse mediante tres tipos de mecanismos: **convección** que implica el transporte del producto o grupo de partículas de un punto a otro, **difusión**, supone el movimiento aleatorio de partículas individuales y **cizallamiento o corte**. Consecuencia de estos movimientos de las partículas puede aparecer el fenómeno de la **segregación**, en el que el mezclado y el desmezclado se producen simultáneamente. En cualquier caso, cuanto más parecidos sean el tamaño, la forma y la densidad de las partículas, más fácil es el mezclado y más homogéneo es el producto resultante.

Se utilizan, fundamentalmente, tres tipos de mezcladores:

a) Mezcladores de cintas, constituidos por una cubeta horizontal semicilíndrica, en la que actúan dos cintas helicoidales montadas sobre un mismo eje, pero en sentidos contrarios. El mecanismo que opera en estos

mezcladores es convectivo y son muy eficaces para sólidos pulverizados que fluyen con dificultad.

b) Mezcladores de volteo, voltean la masa de los sólidos en un tambor giratorio de formas variadas (doble cono, tambores gemelos, …). Resultan adecuados para la mezcla suave de productos pulverizados de características similares.

c) Mezcladores de tornillo interno, formados por un tornillo vertical giratorio situado dentro de un recipiente cilíndrico o cónico. Este tornillo puede estar fijo en el centro del depósito o bien desplazarse alrededor del eje central, cerca de las paredes del recipiente, siguiendo una determinada órbita, disposición esta última más efectiva. Resultan útiles para mezclar pequeñas cantidades de aditivos con una gran masa de producto.

5.3.2. Mezclado de masas y pastas

La mezcla puede producirse por los siguientes mecanismos: **amasado**, las sustancias se comprimen unas con otras o con las paredes del recipiente, **englobamiento**, el producto no mezclado es rodeado por los productos ya mezclados y **cizallamiento o corte**, el producto se estira y rompe bajo la acción de los dispositivos de mezcla. A continuación se comentan los mezcladores más utilizados. Ahora bien, el comportamiento de todos estos mezcladores depende del contacto directo de los dispositivos de mezcla y los componentes de la mezcla, es decir, el material es conducido hasta el agitador o el agitador recorre todo el tanque de mezcla.

a) Mezcladores de cubetas intercambiables. Como su nombre indica, se pueden cambiar las cubetas donde se produce la agitación, al terminar el proceso, de forma directa. Estas cubetas pueden ser estacionarias y giratorias. En las primeras, el dispositivo de mezcla sigue una trayectoria planetaria llegando así a todas las partes del recipiente. En las giratorias, el agitador circula excéntricamente respecto al eje del recipiente, que a su vez va montado sobre un soporte que gira en dirección contraria al agitador. Son útiles para mezclar pastas ligeras.

b) Amasadoras, dispersadores y masticadores. Las amasadoras aplastan la masa, la remueven sobre sí misma y la aplastan de nuevo, sin bien también suelen desgarrar y cortar la masa por la acción de los elementos de mezcla. Se emplean para masas plásticas ligeras. Los dispersadores son

más robustos y admiten más potencia. Se utilizan para incorporar aditivos y colorantes en materiales pesados. Los masticadores son aún más robustos y disponen de más potencia, pudiendo tratar las masas plásticas más duras.

c) Mezcladores continuos, útiles para mezclar y amasar en continuo materiales ligeros o no muy duros. Para ello, se obliga al material a circular a través de una serie de obstrucciones (placas perforadas, parrillas, rejillas, etc.) por medio de un transportador de tornillo. El tornillo gira y, además, suele tener un movimiento alternante, facilitando así el mezclado.

5.4. Operaciones mecánicas sólido-fluido

Se abordan aquellas operaciones de procesado de alimentos cuyo objetivo es la separación, mediante la aplicación de fuerzas, bien de los sólidos contenidos en un fluido, bien de dos fases fluidas de diferente densidad. Por lo general, se realizan a temperatura ambiente evitando así el deterioro de las propiedades de los alimentos por el calor.

5.4.1. Filtración

Consiste en la separación de los sólidos contenidos en una suspensión por retención de los mismos en un medio filtrante poroso que sólo permite el paso, a su través, de la fracción líquida de la suspensión. A la masa de sólidos retenidos se le denomina *torta*. Para conseguir la circulación del líquido a través de la torta y del medio filtrante hay que forzar una diferencia de presiones a ambos lados del sistema filtrante. Según la forma de lograr esa diferencia hay tres tipos de filtros: de presión, de vacío y centrífugos.

a) Filtros de presión, en los que el filtrado se encuentra a presión atmosférica y el alimento a presión superior. Dentro de ellos destacan:

   — Filtros de prensa, formados por una serie alternada de marcos huecos y placas, entre los que se sitúa el material filtrante, ensamblados por una prensa. Son habituales en la preparación de salmueras y siropes y en la recuperación de la levadura en fábricas de cerveza.

   — Filtros de placas horizontales, constituidos por una serie de placas perforadas apiladas, que soportan el material filtrante, situadas den-

tro de una carcasa cilíndrica. Se utilizan en la clasificación de zumos de frutas y bebidas alcohólicas.

— Filtros de hojas, constan de una serie de placas huecas perforadas, sobre las que se soporta el medio filtrante, situadas vertical u horizontalmente en el interior de una carcasa metálica.

b) Filtros de vacío, en los que la alimentación se encuentra a presión atmosférica y el filtrado a menor presión. Los más empleados son los de tambor rotatorio. El material filtrante se soporta sobre un cilindro perforado que gira lentamente, parcialmente sumergido en la suspensión que se va a filtrar. Estos filtros trabajan en continuo, por lo que son útiles para procesos de elevada producción, caso de la extracción del azúcar de caña.

c) Filtros centrífugos, en los que la diferencia de presiones se consigue por efecto de la fuerza centrífuga producida al hacer girar el sistema a alta velocidad. Los más utilizados son los de cesta perforada, que trabajan en régimen discontinuo, y los de empuje alternativo en continuo:

— Centrífugas de cesta perforada. Consisten en un cilindro perforado (cesta) situado en el interior de una carcasa que gira alrededor de su eje. En ellos, la alimentación se realiza a través de una tubería central y el filtrado se extrae a través de una conducción situada en el fondo.

— Centrífugas de empuje alternativo, formadas por una cesta perforada que gira sobre un eje horizontal. La alimentación se produce continuamente por medio de una conducción que acaba en un embudo giratorio, también horizontal. La torta que se va formando es empujada hacia el borde de la cesta por un pistón, mientras que el líquido sale al exterior, a través de la pared del tambor, continuamente.

5.4.2. Sedimentación gravitatoria

Se utiliza para la separación de partículas sólidas contenidas en líquidos, así como para la separación de emulsiones de dos fases líquidas inmiscibles, basándose en la diferencia de densidades entre ambas fases. Para la realización del proceso se utilizan sedimentadores que pueden ser continuos o discontinuos.

a) Sedimentadores discontinuos, consistentes en tanques cilíndricos de gran tamaño, en los que se introduce la suspensión original dejándola sedi-

mentar el tiempo apropiado. La operación se concluye extrayendo el líquido claro por la parte superior y el lodo depositado por la parte inferior del tanque.

b) Sedimentadores continuos, formado por tanques de gran superficie y pequeña altura, por lo general de forma troncocónica y en los que se incorpora la suspensión por un tubo central. El líquido claro se extrae continuamente por el rebosadero que llevan los tanques en la zona periférica superior, mientras que los lodos salen por la conducción de descarga situada en la parte inferior.

5.4.3. Sedimentación centrífuga

Contempla aquellas operaciones de sedimentación que utilizan una fuerza centrífuga para incrementar la velocidad de separación. Dado su elevado coste, resulta rentable en aquellos procesos un poco particulares, como la separación de partículas de pequeño tamaño, o de pequeña diferencia de densidades entre las dos fases, o bien en el caso de productos de alto valor añadido. Los equipos más empleados son:

a) Centrífugas tubulares. Constan de un rotor cilíndrico, de elevada relación longitud/diámetro, que gira en el interior de una carcasa troncocónica a velocidades entre 15.000 y 50.000 rpm. La alimentación se realiza por el fondo de la carcasa, a través de un conducto estático y las dos fases fluidas se extraen por otras conducciones separadas, situadas en lo alto del aparto, de forma continua. Se emplean habitualmente en la eliminación de agua, de grasas y aceites y en la clarificación de zumos y bebidas alcohólicas.

b) Centrífugas de discos, constituidas por una cámara cilíndrica de diámetro mayor que la altura, que gira por la acción de un motor. En el interior de la cámara se encuentra la pila de troncos de cono (discos), ligeramente separados entre sí, y perforados, por los que va a ascender, desde el fondo, la alimentación, de manera que la fracción más densa circula hacia el exterior y la más ligera hacia el interior, por acción de la fuerza centrífuga. Se emplean en el descremado de la leche.

c) Centrífugas de transportador helicoidal, consistentes en un recipiente cilíndrico giratorio, uno de cuyos extremos es de sección cónica y en cuyo interior gira un tornillo helicoidal, a menor velocidad que el cilindro y

en el mismo sentido. Por esta razón, los sólidos son arrastrados hacia el extremo cónico del aparato, mientras que el líquido sale al exterior a través de los rebosaderos.

d) Ciclones, utilizados para separar partículas sólidas (polvo) o gotas de líquido suspendidas en una corriente gaseosa. Están formados por una cámara de sedimentación de forma cilindro-cónica, en la que se introduce el gas tangencialmente por la parte superior y por la acción de la fuerza centrífuga, el polvo se deposita en la parte inferior y el gas limpio sale por una conducción de la parte superior central.

5.4.4. Fluidización

Un lecho fluidizado consiste en un lecho de partículas sólidas, mantenidas en suspensión en el seno de una corriente fluida (líquida o gaseosa), por la acción de la fuerza de rozamiento de la corriente con las partículas, que compensaría el peso de las partículas al circular el fluido a velocidad suficientemente elevada. El grado de mezcla así conseguido es muy alto, comportándose todo el lecho de partículas sólidas como si fuese un fluido. Así mismo, el grado de turbulencia y la superficie de contacto entre las fases es muy elevado. En la industria alimentaria tiene diversas aplicaciones:

a) Secado de alimentos sólidos, tales como guisantes, vegetales troceados y alimentos en polvo. Se emplea aire caliente como agente de fluidización.

b) Congelación de alimentos, tipo maíz, guisantes, fresas, gambas, etc. El agente de fluidización es aire a temperaturas bajas (-25 a -35 ºC) y la congelación resulta muy uniforme.

c) Mezcla de sólidos diferentes, pero formados por partículas de características similares.

5.4.5. Prensado

Consiste en la separación del líquido que humedece un alimento sólido, por aplicación de una fuerza de comprensión. El líquido puede estar empapando externamente al sólido o bien en el interior de las células constituyentes de los ali-

mentos, como en la preparación de zumos de frutas. Para la realización del proceso existen varios tipos de prensas:

a) Prensas hidráulicas, especialmente las de placas, en las que el material se envuelve en lonas filtrantes que se colocan entre placas metálicas, apilándose todo el conjunto entre los cabezales fijo y móvil de una prensa hidráulica. Hoy día, se emplean para pequeñas producciones (aceite, zumos de frutas, etc.).

b) Prensas de rodillos, que combinan la trituración con el prensado de alimentos para la extracción del jugo. Las más frecuentes son las de tres rodillos en triángulo, en las que la alimentación circula de forma continua en los espacios que quedan entre el rodillo superior y los dos inferiores, produciéndose así, de forma casi simultánea, la trituración y el prensado.

c) Prensas de tornillo, consistentes en un cilindro tronco-cónico perforado para permitir la salida del líquido y dispuesto horizontalmente. En su interior lleva un tornillo helicoidal, cuyo paso de rosca decrece en el sentido de circulación de la pulpa prensada, disminuyendo así la sección de paso, lo que incrementa la presión que actúa sobre el sistema. Se emplean habitualmente en la extracción de zumos de frutas y aceites vegetales.

5.5. Destilación

Es la operación unitaria que permite la separación de los componentes de una mezcla líquida, por vaporización parcial de la misma. En la industria alimentaria se emplea, fundamentalmente, en la concentración de aceites esenciales, aromas y bebidas alcohólicas, así como en la desodorización de grasas y aceites.

La destilación puede realizarse de diversas formas, si bien los dos tipos básicos son la destilación simple y la destilación con reflujo.

5.5.1. Destilación simple

En esta operación se lleva a ebullición una mezcla líquida contenida en la caldera, condensándose el vapor que se desprende, que constituirá el destilado, quedando en la caldera el componente menos volátil o residuo. Esta operación

puede realizarse de forma continua, aportando mezcla líquida a la caldera y extrayendo destilado y residuo continuamente, por lo que las composiciones permanecen constantes, o de forma discontinua, por cargas, con lo que la composición de vapor y líquido cambian durante el proceso.

Una variante de la destilación simple es la **destilación súbita o flash** en la que el producto a destilar se hace pasar, a presión elevada, a un cambiador de calor para adquirir la temperatura adecuada. Posteriormente, se pasa a una cámara o columna, donde la menor presión provoca la vaporización parcial de la mezcla, de manera que por la parte superior escapa el vapor mientras la fase líquida lo hace por la inferior.

5.5.2. Destilación con reflujo o rectificación

Una fase de vapor, ascendente, se pone en contacto con una fase líquida, descendente, en el interior de una columna, transfiriéndose materia del líquido al vapor y del vapor al líquido. Como es lógico, los componentes más volátiles del líquido pasan al vapor y los más pesados del vapor al líquido, con lo que el vapor se enriquece en componentes volátiles y la fase líquida se queda sin ellos. El vapor que abandona la columna se condensa y una parte vuelve a la columna como reflujo y otra se retira como destilado, mientras que el residuo se retira de la caldera.

5.6. Extracción sólido-líquido

Es una operación de separación de una mezcla sólida, mediante contacto con un disolvente que solubiliza preferentemente a alguno de sus componentes. La fase líquida resultante contiene el soluto extraído y recibe el nombre de extracto, mientras que la fase sólida restante se denomina, según los casos, residuo o refinado. En efecto, en ocasiones el objetivo de la operación es purificar un alimento sólido por eliminación de los componentes no deseados, que se extraen mediante un disolvente (refinado), mientras que otras veces se pretende recuperar por extracción ciertas sustancias presentes en el sólido (residuo).

Dentro de las numerosas aplicaciones de esta operación en la industria alimentaria, podrían destacarse las siguientes: extracción de azúcar de la remolacha azucarera, extracción del aceite de frutos secos y semillas, recuperación de aceite restante del residuo obtenido en el prensado de la aceituna (aceite de orujo), fabricación de café instantáneo por extracción de los granos tostados y molidos,

recuperación de aromas por extracción con CO_2 supercrítico, etc. El disolvente más utilizado en esta industria es el agua, ya que combina su bajo precio y elevada disponibilidad con una gran capacidad de disolución de numerosos componentes. Ahora bien, si el soluto es de naturaleza orgánica apolar, se suele recurrir a diferentes tipos de hidrocarburos y alcoholes (hexano, ciclohexano, etanol, isopropanol,…), pues el agua no es disolvente para ellos. En cuanto a los equipos empleados hay que distinguir entre los estáticos y los de lecho móvil.

5.6.1. Extractores de lecho estático

Son sistemas en los que la fase sólida permanece estática durante la extracción, haciéndose circular el disolvente a través del lecho de partículas sólidas. Los más característicos son:

a) Extractor de contacto simple, en el que la mezcla sólida se carga por la parte superior y el disolvente también, haciéndolo pasar a través del lecho de sólido, recogiéndose la disolución resultante de la extracción a través de un fondo perforado.

b) Extracción en varias etapas, cargándose en cada una de ellas la mezcla sólida de forma independiente aunque el conjunto de las etapas se encuentra conectado, unas con otras, a través de la circulación de las corrientes del extracto, con lo que se consigue un efecto similar a la circulación en contracorriente de extractos y residuos.

c) Extractor de compartimentos rotatorios, formado por un recipiente cilíndrico, en cuyo interior se sitúa un rotor conectado a una serie de palas que definen una serie de compartimentos en el interior del extractor. Cada uno de estos compartimentos se encuentra en una fase distinta del ciclo de extracción. El giro del rotor hace que cada compartimento pase sucesivamente por esas fases, de forma que una vuelta completa del rotor equivale a un ciclo completo de extracción.

5.6.2. Extractores de lecho móvil

En ellos, las fases sólidas se encuentran también en movimiento, por lo que operan de forma continua. Entre los más señalados, citaremos:

a) Extractor de columna con agitación, en el que la mezcla sólida se carga por la parte superior, descendiendo por gravedad. El disolvente se intro-

duce por la parte inferior, circulando en contracorriente con el sólido. Dispone, además, de un eje central rotatorio dotado de paletas, que permite agitar la mezcla y delimitar etapas de extracción.

b) Extractor de tornillo, en el que el desplazamiento del sólido se produce por un tornillo helicoidal situado en el interior, que posibilita la circulación en contracorriente con el disolvente.

5.6.3. Extracción con fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es aquél que se encuentra a una presión y a una temperatura superiores a las correspondientes al punto crítico. En estas condiciones presenta unas propiedades muy especiales, intermedias entre las de los líquidos y los gases:

- Densidad próxima a la de los líquidos.
- Viscosidad similar a la de los gases.
- Solubilidad dependiente tanto de la temperatura como de la presión.
- Difusividad en un fluido supercrítico mucho mayor que en los gases.

Como consecuencia, los fluidos supercríticos poseen un elevado poder disolvente y de extracción de componentes. Sin embargo, presentan el inconveniente de que hay que operar con ellos a altas presiones, lo que dificulta y encarece el proceso. Así, en la industria alimentaria se emplean en la extracción de la cafeína del café, eliminación del colesterol de la mantequilla, recuperación de sustancias aromáticas a partir de ciertas frutas, etc.

Como disolvente suele emplearse el dióxido de carbono, pues no es inflamable, no es tóxico, posee una gran inercia química y se encuentra libremente en la atmósfera pero, sobre todo, sus condiciones críticas son bajas (Tc = 31,2 ºC; Pc = 73,8 bar) lo que permite trabajar a temperaturas relativamente bajas.

En la práctica, la extracción se lleva a cabo de forma cíclica, al objeto de facilitar la separación y recuperación del disolvente, una vez realizada la extracción.

5.7. Operaciones de separación mediante membranas

Se han desarrollado mucho a escala industrial, dadas las ventajas que presentan: bajo consumo de energía, condiciones de operación suaves, posibilidad

de conseguir elevada selectividad y eficacia así como la utilización de equipos compactos y modulares.

Las operaciones con membranas permiten la separación de componentes, basándose en su capacidad para regular selectivamente el transporte de materia. La *fuerza impulsora* de ese transporte varía con el tipo de operación, pudiendo tratarse de una diferencia de concentración, de presión o de potencial eléctrico.

En función del *objetivo perseguido*, estas operaciones se clasifican en tres grupos:

- Operaciones de concentración de disoluciones, caso de los zumos de frutas, aceites vegetales, enzimas, leche, clara de huevo, café, pasta de tomate,…
- Operaciones de purificación o clarificación, caso de vinos y cervezas, zumos, purificación de agua, etc.
- Operaciones de fraccionamiento, en las que resultan de interés tanto los productos retenidos por la membrana como los que la han atravesado, como puede ser el fraccionamiento de proteínas y enzimas.

Por otra parte, elemento clave en estas operaciones será el *tipo de membrana*. Las que se utilizan comercialmente suelen ser de naturaleza polimérica, destacando fundamentalmente las de celulosa, las de acetato de celulosa, poliamidas aromáticas y alifáticas, poliimidas, poletetrafluoretileno, polipropileno, policarbonatos, polisulfonas y poliacrilonitrilo, sin olvidar las siliconas y el alcohol polivinílico, etc. También se emplean, pero en menor medida, las cerámicas y metálicas. Según posean poros o no en su estructura, las membranas se clasifican en porosas o densas.

Considerando estos hechos, a continuación se describen, brevemente, los principales tipos de operaciones.

5.7.1. Permeación de gases

Se trata de una operación que permite la separación de mezclas de gases o vapores, aplicando una diferencia de presión a ambos lados de la membrana. Los componentes de la mezcla tienden a desplazarse en el sentido en el que disminuyen sus presiones parciales. Las membranas utilizadas son densas y suelen ser de naturaleza polimérica: poliimidas y policarbonatos.

5.7.2. Pervaporación

Las fases en contacto con la membrana son un líquido y un gas. Los componentes de la fase líquida tienden a atravesar la membrana y pasar a la fase gas, experimentando un cambio de fase. Para ello hay que aplicar una diferencia de presiones a ambos lados, pues para que un componente tienda a transportarse es necesario que su presión parcial en el gas sea inferior a su presión de vapor a la temperatura de trabajo.

La pervaporación se ha utilizado en la industria alimentaria para la disminución de la concentración de alcohol en vinos, cerveza y licores, mediante membranas de polidimetilsilicona.

5.7.3. Diálisis

Es una operación en la que la membrana separa solutos en función de su tamaño. Las dos fases en contacto con la membrana son líquidos, impulsando el proceso la diferencia de concentración del soluto a transportar.

Las membranas de diálisis son en su mayoría porosas, desplazándose los solutos, por difusión, a través de los poros. Como membranas poliméricas pueden emplearse las de celulosa y las de acetilcelulosa. Se han utilizado para reducir la concentración de alcohol en cervezas aunque, al producir la separación de otros componentes de bajo peso molecular, puede afectar al sabor y al aroma de la bebida.

5.7.4. Electrodiálisis

La electrodiálisis es una operación de separación electroquímica, que permite diferenciar entre especies neutras y especies iónicas, mediante la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico como fuerza impulsora. La base de la separación está en el empleo de membranas de intercambio catiónico y aniónico que dejan pasar los cationes y aniones, respectivamente. Para ello, estas membranas deben estar cargadas: negativamente las que permiten el paso de cationes y positivamente las que facilitan el paso a los aniones.

Estas membranas suelen ser de naturaleza polimérica, muy frecuentemente polietileno, en las que las cargas negativas están asociadas a grupos SO_3^- ancla-

das en el polímero por clorosulfonación y las positivas a iones amonio anclados por aminación.

Las unidades de electrodiálisis están formadas por cientos de pares de celdas situadas entre los electrodos. Al aplicar una diferencia de potencial eléctrico, los cationes de la disolución emigran al cátodo y los aniones hacia el ánodo. El resultado final del proceso son dos disoluciones, una pobre en iones y otra con una alta concentración salina.

Como aplicaciones más frecuentes relacionadas con el sector alimentario pueden citarse: la desalinización de aguas salobres para obtener agua potable, la desmineralización del suero de queso, la eliminación del ácido tartárico del vino, la desacidificación de zumos de frutas, etc.

5.7.5. Microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa

Son operaciones con fundamentos muy similares, que permiten separar los componentes de una disolución mediante la aplicación de una diferencia de presión absoluta como fuerza impulsora. Así, la membrana deja pasar el disolvente de la disolución y retiene los solutos. La aplicación de la diferencia de presión permite que el disolvente circule en contra del gradiente de concentración, es decir, desde la disolución más concentrada en soluto hacia la más diluida.

Las principales diferencias entre ellas radican en el tamaño de los solutos que retienen y, por tanto, en las diferencias de presión que hay que aplicar.

a) En la microfiltración se retienen y separan partículas sólidas, con tamaños entre 0,1 y 10 μm, por lo que la diferencia de presión a aplicar es pequeña, entre 0,1 y 2 atm. Las membranas son porosas y habitualmente poliméricas, tipo acetato de celulosa, poliamidas, politetrafluoretileno, plipropileno, policarbonatos,… Esta operación se emplea como método de clarificación y estabilización biológica en vinos y cervezas y también en la clarificación de antibióticos.

b) En la ultrafiltración se separan partículas de menor tamaño (partículas coloidales, macromoléculas, …), lo que requiere mayores diferencias de presión, entre 2 y 10 atm. Las membranas empleadas son porosas, con diámetros de poro entre 1 y 100 nm, del tipo celulosa, poliamidas, poliimidas, polisulfonas, poliacrilonitrilo, etc. En la industria alimentaria se emplea para preconcentrar la leche en la fabricación de queso, recuperación de lactoalbúmina y lactoglobulina del suero de queso, clarificación de vinos, concentración de gelatinas, …

c) En la ósmosis inversa, para invertir el flujo de disolvente y hacer que fluya en contra del gradiente de concentración, la diferencia de presión aplicada debe ser, como mínimo, mayor que la presión osmótica, de ahí que sea mayor que en los casos anteriores (5-100 atm).

   Se suelen utilizar membranas densas, generalmente hidrofílicas, tipo poliamidas aromáticas y poliimidas. Si las especies a retener fueran iónicas, hay que emplear membranas con carga eléctrica como en la electrodiálisis.

   En la industria alimentaria tiene múltiples aplicaciones: separación de componentes valiosos de efluentes acuosos (aromas, ácidos, azúcares, proteínas), regeneración de aguas de lavado, eliminación de alcohol en vinos, clarificación de zumos, etc.

5.7.6. Módulos de membrana

Se denomina así a la unidad más pequeña en la que se puede empaquetar la membrana. La geometría en la que se fabrican las membranas puede ser plana o cilíndrica. Las membranas planas se pueden empaquetar para formar módulos de platos y también marcos o módulos en espiral. Las cilíndricas, por su parte, pueden disponerse en módulos tubulares y módulos de fibra hueca. Estos últimos son muy interesantes, pues tienen una muy alta densidad de empaquetamiento (área de transferencia de materia disponible por unidad de volumen de módulo), con valores que pueden alcanzar los 30.000 m^2/m^3 y además pueden soportar elevadas diferencias de presión, dado el pequeño diámetro de las fibras (menor de 100 μm).

6. DISEÑO HIGIÉNICO DE LOS SISTEMAS AUXILIARES

Aunque ya se ha comentado anteriormente, con todo detalle, la normativa vigente para el diseño higiénico en la industria alimentaria, vamos a centrarnos en los aspectos concretos referidos a los principales sistemas auxiliares en posible contacto con los alimentos.

6.1. Conducciones y tuberías

En todos los casos, deberán ser fácilmente desmontables para su inspección y limpieza.

Las juntas de unión deben estar realizadas con material sanitario autorizado.

Las tuberías deben estar construidas por estirado en frío y carecer de soldaduras y rugosidades internas.

Las tuberías, conducciones y válvulas deber ser totalmente escurribles (pendiente mínima 1%) y no presentar recovecos ni zonas muertas.

Se respetará una distancia mínima de 10 cm entre tuberías o bien entre la tubería y la pared.

Es aconsejable la utilización de válvulas de mariposa, ya que son las que mejor cumplen los requerimientos higiénicos. Por el contrario, en los sistemas de limpieza *in situ* no se recomienda el uso de válvula de bola. En cualquier caso, una válvula tendrá diseño higiénico cuando sea autovaciante, debido a que no se producirán acumulaciones de suciedad al interrumpirse el flujo.

Los cierres y juntas deberán resistir los cambios de temperatura a los que son sometidos por los diversos tratamientos, sin formar huecos (11).

6.2. Desagües, lavamanos y lavapiés

Los desagües deben permitir la limpieza y saneamiento del suelo, facilitando la rápida evacuación de los deshechos líquidos. Además, tanto desagües como canalones deber estar equipados con rejillas y sumideros para retener los restos sólidos y facilitar la limpieza (12).

Los lavamanos deben disponer de agua caliente y fría o agua premezclada, un producto detergente y toallas de un solo uso. Por otra parte, los grifos no podrán abrirse con las manos.

Los lavapiés deben estar en los accesos a las "zonas limpias", para evitar la contaminación por las suelas de los zapatos.

6.3. Bombas

A la hora de elegir una bomba en el sector alimentario hay que contar con tres criterios: mecánico-hidráulico, diseño higiénico y aspecto económico (2).

Las que estén en contacto con el alimento deberán tener las siguientes características:

- La superficie de contacto será pulida.

- Se evitarán zonas muertas para eliminar las acumulaciones de suciedad.
- Fácilmente desmontables, con un número reducido de piezas.
- Fácil drenaje y llenado.
- Los rodamientos no estarán en contacto con el alimento.
- Terminación externa en acero inoxidable y fácil de limpiar.

Las más higiénicas son las peristálticas, pues el alimento sólo contacta con la superficie del tubo, pero no se usan demasiado. También son adecuadas las de membrana, las de vacío, las centrífugas y las rotativas, entre otras.

6.4. Depósitos

El fondo deberá ser redondeado o cónico y con una válvula de drenaje. Además tendrán una inclinación mínima del 1% para que escurran bien por gravedad (3).

No deben aparecer resaltes ni rebabas en las zonas de soldadura. La unión de las partes metálicas mediante soldadura deben hacerse preferentemente con las láminas paralelas y la soldadura se debe desbastar con las superficies adyacentes para evitar la aparición de hoyos y grietas.

Deberán estar provistos de tapa, con un sistema de bisagra exterior, siendo la tapa de mayor diámetro que el depósito. Además, dispondrán de bocas de hombre para acceso de limpieza e inspección, que serán de fácil apertura y desmontaje.

En el caso de disponer de grifos, éstos deberán poder ser desmontados para su higienización.

Si el tanque dispone de agitadores interiores o de cualquier otro tipo de mecanismos, el sellado de las juntas deber estar bien realizado y controlado para evitar la contaminación con aceites lubricantes o materias extrañas.

6.5. Instalaciones eléctricas e iluminación

Cada uno de los elementos que componen el equipo eléctrico deberán estar limpios y permanecer cerrados para evitar el anidamiento de roedores e insectos o cualquier otra clase de suciedad.

Debe garantizarse la estanqueidad de todos los aparatos eléctricos en las zonas de manipulación de alimentos en las que se llevan a cabo prácticas higienizantes utilizando agua o espuma. Sobre todo si se realiza con equipos de alta presión (12).

Por otra parte, es imprescindible una buena iluminación para poder garantizar unas correctas condiciones higiénicas en la instalación.

Así mismo, el sistema de iluminación se hallará en puntos fijos y, en caso de bombillas o tubos fluorescentes, protegidos por compartimentos estancos.

La legislación exige que el sistema de iluminación esté protegido de forma que en caso de rotura no contamine los alimentos y su fijación al techo o a las paredes debe permitir la limpieza fácil y evitar la acumulación de polvo.

Se recomienda utilizar una intensidad lumínica adecuada en función del área considerada. Así, se proponen las siguientes intensidades:

- Zona de inspección: 540 lux.
- Zona de trabajo: 220 lux.
- Otras zonas: 110 lux.

6.6. Cámaras frigoríficas

Deberán estar fabricadas con materiales resistentes a los choques, fáciles de limpiar y desinfectar e inalterables. Los materiales de aislamiento deben ser inodoros e imputrescibles.

Las líneas de unión de paredes y suelos y las de los paneles, en el caso de cámaras desmontables, deberán estar sellados convenientemente, sin dejar juntas al descubierto.

No se permite la compartición de la misma cámara a productos de distinta carga contaminante, como es el caso de los productos acabados y las materias primas.

La altura de almacenamiento de producto dentro de la cámara frigorífica no superará a los evaporadores y además estará a 1 m como mínimo del techo. Se recomienda el estibado de los productos sobre pallets o tarimas de altura mínima de 5 cm desde el suelo. La distancia entre los productos almacenados y los conductos de refrigeración deberá ser de 50 cm como mínimo.

No se deberá superar una ocupación mayor de 0,8 m^2/m^2, con pasillos adecuados que faciliten la inspección.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Shore, D. T. & Jowitt, R. (1971) Design and operation of food plant. In Hygiene and Food Production. Ed.: Fox, A. Edinburgh, Churchill Livingstone.
2. Casp Vanaclocha, A. (2004) Diseño de industrias agroalimentarias. Madrid. Mundi Prensa.
3. Gómez, G. (1995) La higiene en la industria cárnica. Alimentación, equipos y tecnología (enero-febrero): 67-91.
4. Puig-Durán Fresco, J. (2002) Ingeniería, Autocontrol y Auditoría de la Higiene en la Industria Alimentaria. Madrid. Mundi Prensa.
5. Moreno, B. (1995) Las industrias están muy dispuestas a utilizar el sistema de análisis y control de productos cárnicos. *Cárnica 2000* (octubre): 65-72.
6. Milledge, J. J. & Jowitt, R. (1980) The cleanability of stainless steel used as a food contact surface. *Proceedings of the Institute of Food Science and Technology*. **13:** 57-62.
7. Askeland, D. R. (2001) Ciencia e Ingeniería de los Materiales. Madrid. Paraninfo.
8. De Saja Sáez, J. A. y col. (2005) Materiales. Madrid. Thomson-Paraninfo.
9. Campden Food Preservation Research Association (CFPRA) (1983) Hygienic design of Food Processing Equipment. Report of the Working Party on Hygienic Design.
10. Rodríguez Solominos, F. y col. (2002) Ingeniería de la industria alimentaria. Vol. II. Madrid. Síntesis.
11. Brennan, J. G. y col. (1980) Las operaciones de la ingeniería de los alimentos. Zaragoza. Acribia.
12. Sancho, J., Bota, E. y de Castro, J. J. (1996) Autodiagnóstico de la calidad higiénica en las instalaciones agroalimentarias. Madrid. Mundi Prensa.

10. Legislación de los Alimentos Europea y Española

JOSÉ IGNACIO ARRANZ RECIO
Director General del Foro Interalimentario

1. INTRODUCCIÓN

Abordar la preparación de un capítulo relativo a la Legislación de los Alimentos Europea y Española en una Monografía titulada "Aspectos Higiénicos de los Alimentos Microbiológicamente Seguros", no es tarea fácil. Primero, porque corre el riesgo de sobrenadar —o de hundirse— entre capítulos que, sin duda, resultarán a priori más atractivos para el lector. Por otra parte, el título de la monografía parecería condicionar el ámbito y los límites de la normativa que ha de tratarse en este capítulo: Producción normativa al servicio de la seguridad microbilógica. He descartado ese enfoque, no sólo por la dudosa utilidad de tal fragmentación, sino porque resulta materialmente imposible hacer una selección de normas que se dediquen en exclusiva a la regulación de los peligros biológicos. Tales normas existen, pero quedan vacías de contenido si las tratamos de gestionar abstrayéndonos de otras normas transversales que abordan lo biótico, lo químico y lo físico y, sobre todo, los Principios Generales.

Por último, a la hora de elegir el enfoque de este capítulo se impone el pragmatismo más básico: ¿Merece la pena elaborar un "vademecum", un "prontuario" de una legislación que dista mucho de ser estática? ¿Qué actualidad e interés tendría este capítulo a los pocos meses de su publicación? Por todo ello, se ha optado por una exposición más analítica que descriptiva, que permita al lector conocer la evolución del marco legal alimentario y, más que los resulta-

dos, las razones, con mínimas incursiones a ejemplos concretos, hoy vigentes pero derogables quizá en pocos meses.

Y, por último, sin grandes posibilidades ni voluntad de separar la legislación española de la europea, por cuanto esa separación ni responde a la realidad, ni permite utilizar la legislación como lo que verdaderamente es: Una herramienta al servicio de la gestión del riesgo alimentario.

2. CONCEPTOS

2.1. Seguridad Alimentaria: El concepto de Seguridad Alimentaria: Inocuidad, Seguridad de Abastecimiento Alimentario, Seguridad Alimentaria

Es necesario saber sobre qué hemos de legislar. El **concepto de Seguridad Alimentaria** se ha ido acuñando bajo tal denominación en los últimos años. Hay diversas teorías que tratan de explicar por qué la denominación "higiene de los alimentos" ha ido evolucionando hacia la expresión más en uso en la actualidad.

La Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, FAO, mantiene "su" concepto tradicional de Seguridad Alimentaria para referirse a la seguridad y suficiencia de abastecimiento y acceso a una cantidad suficiente de alimentos. Y conserva la expresión "inocuidad" para referirse al alimento exento de factores de peligro susceptibles de causar enfermedad alimentaria en el consumidor.

Haciendo valer la expresión "seguridad alimentaria" para circunscribirla al atributo de inocuidad, hay quienes sostienen que el término "higiene alimentaria" ha quedado superado por sus connotaciones estáticas y de restricción a los productos, en tanto que seguridad alimentaria sería un concepto donde además de los alimentos tendrían cabida los procesos de producción, transformación, distribución y elaboración de aquéllos.

En el mismo sentido, quienes defienden esta tesis, la refuerzan con una pretendida base lingüística: Seguridad Alimentaria sería la traducción adecuada del término anglosajón "food safety", en tanto que el concepto tal como lo entiende la FAO, seguridad de abastecimiento y acceso, provendría de "food security". Sin que la cuestión merezca más polémica, nosotros no compartimos esa teoría, pues el término "security" no suele aparecer en los manuales de inocuidad de alimentos en lengua inglesa y sí tiene otras acepciones distintas de la inocuidad. Baste además recordar la puntualización, plausible, de las autoridades francesas

cuando bautizaron su AFSSA: Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de Alimentos… bien es cierto que con ello los franceses han pretendido establecer diferencias entre inocuidad, suficiencia y atributos alimentarios distintos de la inocuidad pero vinculados, en más o en menos, a la misma, como podría ser el caso de la calidad.

Consideramos mucho más cerca de la realidad a quienes entienden que calidad no es sinónimo de seguridad, ni de inocuidad, ni comprende ninguna de estas acepciones. Aparte de que la calidad está integrada por atributos objetivos, mensurables, y otros de pura percepción subjetiva, la realidad es que un producto de alta calidad puede estar contaminado y no ser inocuo. Entre los factores intrínsecos de la composición al servicio del concepto objetivo "calidad", y que también sustentan el valor nutricional e incluso el gastronómico de un alimento, no está la inocuidad. Preferimos mantener "inocuidad" como el concepto que representa la ausencia de factores de peligro, endógenos o exógenos, actuales o potenciales, en un alimento o ingrediente destinado al consumo humano o animal.

En toda esta polémica terminológica hay un elemento que sí nos interesa destacar: Es preciso recuperar el concepto dinámico de cualquier denominación que utilicemos para referirnos a la inocuidad. Porque inocuidad y seguridad alimentaria expresan, en realidad, un resultado que, incluso como tal, es susceptible de evolución o retroceso.

La seguridad alimentaria es, por tanto, el resultado dinámico de un conjunto de procesos. No cabe asumirla como algo intrínseco de un alimento, y es preciso generarla, tutelarla y, cuando proceda, reconducirla.

Para ello contamos con una amplia gama de recursos o "herramientas", que habrán de utilizarse de forma acumulativa y no excluyente, acaso con la excepción del Principio de Precaución y la Red de Alerta como mecanismos de excepción. Podemos afirmar que tales recursos quedan comprendidos en el concepto de Análisis de Riesgos Alimentarios.

2.2. El Análisis de Riesgos Alimentarios: La legislación alimentaria como elemento de gestión del riesgo alimentario

Tanto el Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria de la Comisión Europea como el Reglt^{o} 178/2002 (**por el que se establecen los Principios y Requisitos Generales de la Legislación Alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan Procedimientos relativos a la Seguri-**

dad Alimentaria) reafirman el Análisis de Riesgos Alimentarios (ARA) como base de las políticas de seguridad alimentaria.

Como concepto integrador de actuaciones secuenciales e interrelacionadas, el ARA se consideró novedoso cuando fue adoptado por el Codex Alimentarius. Es sabido que el Análisis de Riesgos Alimentarios es un proceso que consta, necesariamente, de **tres componentes: Evaluación del riesgo, Gestión del riesgo y Comunicación del riesgo**.

Cada una de esas tres componentes ha sido herramienta de trabajo en la consecución de la seguridad alimentaria desde hace tiempo. Lo novedoso radica en integrarlas en un proceso, y hacerlo de forma que evaluación, gestión y comunicación constituyan una **secuencia cronológica y conceptual**; que la evaluación sea la base de cualquier medida de gestión; y que la comunicación no se restrinja a las componentes previas consideradas individual y no conjuntamente.

Esa consideración secuencial trae consigo el otro elemento innovador de la triada del análisis de riesgos: La ineludible **interrelación entre las tres componentes** y la interactividad entre quienes se dedican a cada una de ellas. Quedan así desterradas teorías como la que imponía una separación intelectual y casi física entre los evaluadores y los gestores de riesgos, pretendiendo con ello salvaguardar la independencia de los primeros. Se avanza en coherencia, en funcionalidad, en eficiencia y en proporcionalidad.

A los efectos que nos ocupan en este capítulo, pondremos el acento en una de las componentes de la triada del Análisis de Riesgos, precisamente la que alberga. Desde el punto de vista conceptual, las normas que vienen a ordenar y a sentar las bases de la seguridad alimentaria: La Gestión de Riesgos Alimentarios.

El Codex Alimentarius, en la XVII edición de su Manual de Procedimiento define **"Gestión de Riesgos":** Proceso distinto de la evaluación de riesgos que consiste en ponderar las distintas **opciones normativas**, en consulta con todas las partes interesadas y teniendo en cuenta la evaluación de riesgos y otros factores relacionados con la protección de la salud de los consumidores y la promoción de prácticas comerciales equitativas y, si fuera necesario, en seleccionar las posibles **medidas instrumentales** apropiadas de prevención y control.

Merece la pena detenerse en el contenido de la definición de Gestión de Riesgos, que el Codex desarrolla en menor medida que la de Evaluación de Riesgos.

Existe una cierta tendencia a la interpretación parcial, restrictiva, del concepto de gestión de riesgos. Para muchos, en tanto que lo entienden como resultante del proceso de evaluación previa —lo cual es correcto— la gestión se

limitaría a la ordenación de reglas y procedimientos mediante disposiciones normativas vinculantes o actos de normalización y estandarización voluntarios.

Otros apuestan por una concepción finalista de la gestión del riesgo, limitándola a la adopción de medidas de control e intervención rápida.

Una de las bondades del concepto es, precisamente, su concepción integradora de las medidas normativas y las instrumentales, dando cabida a que las primeras puedan existir sin las segundas, y que éstas puedan adoptarse incluso en ausencia de base normativa que las ampare, cuando es la evaluación del riesgo lo que verdaderamente las justifica.

Desde la óptica del Análisis de Riesgos, la legislación alimentaria se encuadra en la Gestión de Riesgos, en este caso **normativa** y no instrumental. Necesariamente, la legislación alimentaria ha de basarse en la evidencia científica que le proporciona la previa Evaluación de dichos Riesgos.

3. SEGURIDAD ALIMENTARIA: CONFORMIDAD A UN MARCO DE REFERENCIA

En una aproximación muy simple, pero cierta, cabría afirmar que la seguridad alimentaria es la consecuencia que se obtiene cuando, en la industria alimentaria —en realidad, en el conjunto de la cadena— los procesos se desarrollan y los productos se obtienen de acuerdo con unas reglas previamente elegidas y establecidas. Teóricamente, si dichas reglas son plenamente adecuadas, plenamente practicables y el operador económico las cumple escrupulosamente, la inocuidad de los alimentos estaría asegurada sin necesidad de recurrir al control oficial.

De esta consideración ya se deduce la trascendencia que tiene acertar en el diseño, generación y actualización de tales reglas de referencia.

De una u otra forma, los países ordenan esas reglas en un marco particular, encuadrado en su Ordenamiento interno pero con unas peculiaridades que las diferencian de otros cuerpos legales. Resaltaríamos quizá la ineludible necesidad de sustentar tales reglas en la mejor evidencia científica, diseñarlas en una conjugación adecuada de intereses imperativos y, sobre todo, establecer mecanismos de actualización permanente. Es a dichas reglas específicas, sean sustantivas o instrumentales, a las que nos referiremos especialmente en el presente Capítulo, y son tales reglas las que comúnmente se identifican con el concepto de Legislación Alimentaria o Normativa Alimentaria, conceptos más restrictivos que el de Derecho Alimentario en su consideración más amplia e integradora.

No incidiremos aquí, por tanto en las Disposiciones generales de cuerpos normativos transversales, como puedan ser las referentes al Procedimiento Administrativo o incluso las Penales, más que para mencionar su interrelación con la normativa alimentaria específica, de carácter fundamentalmente técnico-sanitario, y la necesidad de que ésta última se considere y aplique, en todo caso, en el marco genérico constituido por códigos no alimentarios (administrativo, mercantil, internacional, penal…).

4. CARACTERÍSTICAS Y FUENTES DEL DERECHO ALIMENTARIO

El Derecho Alimentario presenta algunas **características** que conviene tener en consideración antes de profundizar en la normativa específica de seguridad alimentaria, que en modo alguno puede sustraerse ni a los principios generales de aquél ni a algunas de sus peculiaridades.

- Presenta una importante dispersión de sus normas, por lo que su tratamiento unitario resulta difícil.
- Encontramos disposiciones y preceptos que condicionan la aplicación de las Disposiciones técnico-sanitarias desperdigados en distintas ramas jurídicas (Administrativo, Penal, Mercantil, Internacional, etc…).
- Tiene su origen en distintos ordenamientos: Nacional, Supranacional (Unión Europea) e Internacional (Codex Alimentarius). A su vez, el Ordenamiento interno del Estado español tiene como fuentes del Derecho alimentario el Estado, las Comunidades Autónomas e, incluso, las Entidades Locales.

4.1. Ordenamiento Interno

Desde 1978, **la Constitución Española** establece los derechos del ciudadano que deben verse garantizados, entre otros, desde el Derecho Alimentario. El Artículo 43.1 reconoce el derecho a la protección de la salud y el 43.2 encomienda a los poderes públicos organizar y tutelar la salud pública (en la cual se incardina la seguridad alimentaria). Para ello, "la ley establecerá los derechos y deberes de todos al respecto".

Por su parte, el Artículo 51.1 establece que "Los poderes públicos garantizarán la defensa de los consumidores y usuarios, protegiendo, mediante procedimientos eficaces, la seguridad, la salud y los legítimos intereses económicos de los mismos". Y el Artículo 51.3, que "…la ley regulará el comercio interior y el régimen de autorización de productos comerciales", supuestos ambos en los que cabe, de pleno derecho, la alimentación.

En los mencionados artículos de la Constitución y en los títulos habilitantes comprendidos en dicha Carta Magna (Artículo 149. 1. 13ª y 16ª, que atribuyen al Estado la competencia exclusiva en materia de bases y coordinación de la planificación general de la actividad económica y de bases y coordinación general de la sanidad, respectivamente, se sustentan leyes como la 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad, de la que nos afecta particularmente su artículo 40, o la Ley 26/1984, General para la Defensa de los Consumidores y Usuarios, modificada en última instancia por la Ley 44/2006, de 29 de diciembre, de mejora de la protección de los consumidores y usuarios (que en su disposición final octava modifica la Ley 11/2001, por la que se creó la Agencia Española de Seguridad Alimentaria para reforzar sus competencias en materia de nutrición comunitaria y cambiar, en consecuencia, su denominación por la de Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). El Real Decreto Legislativo 1/2007, de 16 de noviembre, sirvió para aprobar el texto refundido de la Ley General para la Defensa de los Consumidores y Usuarios y otras leyes complementarias.

Las mencionadas leyes estatales son, por tanto, las fuentes primordiales de Derecho alimentario en el Ordenamiento interno, aunque también son fuentes de Derecho alimentario, desde las Comunidades autónomas, los Estatutos de Autonomía y las Leyes autonómicas con contenido en seguridad alimentaria. Y, desde las entidades locales, las Ordenanzas municipales.

Con anterioridad a la Constitución de 1978, evidentemente, ya existía un cuerpo normativo de notable especificidad en materia alimentaria. Desde el Real Decreto de 22/12/1908 (derogado por el R.D. 1945/1983, sobre infracciones y sanciones en materia alimentaria) hasta nuestros días, el el ordenamiento alimentario como fruto de vicisitudes históricas ha pasado por distintas etapas.

El Código Alimentario Español agrupa de forma sistemática la normativa alimentaria. Sus fuentes son, el Derecho Comunitario Derivado y, en muchos casos, el Derecho interno que ahora analizamos. También de forma indirecta (por cuanto no tiene capacidad para dictar o aprobar normas vinculantes, el Codex Alimentarius, como "inspirador de los códigos alimentarios de sus Países miembros (más de 160), entre los cuales está España.

El Código Alimentario Español es el "Cuerpo orgánico de normas básicas y sistematizadas relativas a los alimentos, condimentos, estimulantes y bebidas, sus primeras materias correspondientes y, por extensión, a los productos, materias, utensilios y envases de uso y consumo doméstico". Sus orígenes datan de 1955, cuando se encomienda a una Comisión (heredera de la antigua Comisión de Productos Coloniales de 1948) la redacción y estudio de proyectos de normas alimentarias. Posteriormente, una Subcomisión de expertos recibe el encargo de redactar el Codigo Alimentario Español (CAE) en 1961, que se aprueba por Decreto 2484/1967 y entra en vigor por Decreto 2519/1974. Su desarrollo se encomendó a la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria, pero hasta 1982 prácticamente no se llevó a cabo. El Síndrome tóxico 1981-1982 (aceite de colza desnaturalizado), la mayor catástrofe en seguridad alimentaria acaecida en un país industrializado, supuso un auténtico revulsivo que se tradujo en la aprobación de medidas parlamentarias que condujeron al desarrollo de una batería de 80 normas alimentarias. El CAE quedó estructurado en 5 partes: Principios generales (3 capítulos), Condiciones generales (6 capítulos), Alimentos y bebidas (21 capítulos), Aditivos e impurezas (5 capítulos) y Productos directamente relacionados con los alimentos (3 capítulos).

Su desarrollo final y actualización permanente se encomendó a la CIOA, a través de su Secretaría General (Real Decreto 1456/1982).

El CAE, como estructura de ordenación de normas, sigue vigente, aunque el ingreso de España en la CEE, a partir del 1 de enero de 1986, modificó sustancialmente su contenido y su dinámica de desarrollo y actualización. El CAE debió dar asiento al "acervo comunitario", todas aquellos Actos Normativos que la CEE había aprobado con anterioridad al ingreso de España y que ahora le afectaban como Estado miembro. Muchas Disposiciones del CAE colisionaban en todo o en parte con el acervo comunitario, lo que impuso necesidades de derogación y modificación que se prolongaron durante años, en el transcurso de los cuales el Reino de España debió afrontar diversos procedimientos de infracción por cuanto sus antiguas normas podían servir de base a medidas de efecto equivalente a las restricciones a la importación o, en general, generar trabas a la libre circulación de mercancías amparada por los Artículos 30 a 36 del Tratado de Roma.

Por otra parte, las Instituciones comunitarias seguían legislando, en aquella época con prevalencia de la forma Directiva, que obligaba a la incorporación al Ordenamiento interno mediante transposición. España debía incorporar tales Directivas y, al mismo tiempo, como socio comunitario que había cedido soberanía normativa a las Instituciones de la CEE, veía restringida de

forma creciente su capacidad para legislar de forma unilateral en el ámbito de su Derecho interno. Las iniciativas de Derecho interno quedaban circunscritas a aquellos ámbitos del Derecho alimentario en los que el Legislador Comunitario no había legislado ni manifestado su intención de legislar, o bien a aquellos otros, potencialmente armonizables, para los que el Legislador Comunitario optó por el Principio de Subsidiariedad: Las Instituciones Comunitarias sólo legislarían en aquellos aspectos en los que la acción común arrojase un valor añadido superior a la suma de actuaciones independientes de los Estados miembros.

Esta situación, acrecentada hasta sus máximos exponentes, es la que caracteriza el momento actual. Aunque, como luego se comentará, el Legislador Comunitario llegó a la conclusión de que la prolificidad de Actos no garantizaba la libre circulación en el Mercado Interior, trató de reducir gradualmente las áreas sin armonizar, en las que los Principios de Reconocimiento Mutuo y Equivalencia Normativa no aseguraban la consecución del espacio sin fronteras, ni siquiera con la ayuda de la abundante jurisprudencia del Tribunal de Luxemburgo.

En definitiva, podríamos concluir que hoy, el Ordenamiento alimentario español se nutre, fundamentalmente, de iniciativas comunitarias, cada día con mayor predominio de los Actos de aplicación directa (Reglamentos, Decisiones) y menores obligaciones de transposición. Y que las iniciativas de Derecho Interno han quedado relegadas a ámbitos muy concretos o a simples aspectos instrumentales al servicio de la aplicación de los Actos sustantivos procedentes del Derecho Comunitario Derivado.

4.2. El Derecho Comunitario en la legislación en materia alimentaria

Como, tal como acabamos de exponer, la producción normativa de Derecho Interno ha ido cediendo terreno al Derecho Comunitario como fuente predominante de nuestras Disposiciones legales en materia alimentaria, es importante conocer algunos de sus elementos básicos. La Unión Europea es un organismo de carácter supranacional. Más allá de la internacionalización, la supranacionalidad conlleva un grado variable de cesión de soberanía en lo que se refiere a la capacidad de dictar normas que, por cuanto han de ser comunes a todos los Estados miembros, han de promulgarse por las Instituciones comunitarias: El Consejo de la UE, en el que los gobiernos de los Estados miembros están representados; el Parlamento Europeo y la Comisión Europea,

teóricamente relegada a un papel de control pero con capacidad normativa en la práctica.

Dado que la mayoría de las Disposiciones que hoy constituyen el Marco Legal Alimentario proceden directa o indirectamente del **Derecho comunitario**, conviene analizar **sus fuentes y algunas de sus características**.

4.2.1. Las Fuentes del Derecho Comunitario

Las **Fuentes** del Derecho Comunitario son el Derecho primario (los Tratados) y el Derecho derivado (Artº 249 del Tratado) (Actos comunitarios, sean Vinculantes, es decir, con capacidad de crear derechos y obligaciones en las personas físicas y jurídicas, o no vinculantes. Son vinculantes los Reglamentos, las Directivas y las Decisiones, así como la Jurisprudencia del Tribunal de Justicia de Luxemburgo y las Comunicaciones de la Comisión Europea en aquellos aspectos basados en dicha Jurisprudencia. Entre las no-vinculantes tenemos las Recomendaciones, los Dictámenes y las Conclusiones.

4.2.2. Sus características

Algunas de sus **características** propias inciden en la génesis y aplicación del marco legal alimentario. Entre ellas, destacamos:

- Su efecto directo (Sentencias Van Gend-Loos 1963 y Simmenthal, 1978): Las normas comunitarias no necesitan ser traducidas a normas de derecho interno (*); son fuente inmediata de derechos y obligaciones para los concernidos, ya sean Estados o particulares, y son directamente invocables ante los Tribunales nacionales.
- Su primacía sobre los ordenamientos nacionales (Sentencia Costa-Enel, 1964): en caso de contradicción entre la norma estatal y la comunitaria prima esta última.

(*) Las Directivas, en tanto que obligan en los fines pero no necesariamente en los medios, precisan ser incorporadas al Ordenamiento interno, mediante u procedimiento de transposición, dentro de unos plazos establecidos para cada una de ellas. Agotados dichos plazos, si un Estado no las ha incorporado, pasan a ser de aplcación inmediata con efecto directo y son invocables como tales ante los Tribunales nacionales e internacionales.

Y aunque no siempre puedan ser enunciados como Principios Generales ni características intrínsecas, no podemos dejar de reparar en otros aspectos que, igualmente, influyen de forma importante en el marco legal alimentario:

- El carácter económico del Tratado: El artículo 14 del Tratado Fundacional (consecutivo a las funciones de los Tratados CEE, CECA y Euratom) define los objetivos del mercado común: libertad de circulación de mercancias, personas, capitales y servicios. Para la libre circulación de mercancías se establece una aproximación de legislaciones, con arreglo al procedimiento codecisión, previa consulta al Comité Económico y Social. Las excepciones a la Libre Circulación de Mercancías responden a razones de los artículos 30 a 36 del TCE (exigencias imperativas, entre las que se encuentra la protección de la salud). Aunque en el propio TCE se recoge la protección de la salud en el ámbito de la Comunidad Europea (Art. 152 del Tratado vigente) y se establece como objetivo la "Garantía de alto nivel de protección de la salud humana", la dinámica comunitaria ha sido siempre un equilibrio inestable entre "la Europa de la Libre Circulación" y lo que se ha dado en llamar la "Europa de los Ciudadanos". La impronta economicista de la UE, en general prevalente, remite cíclicamente —por ejemplo, con ocasión de las crisis alimentarias que ilustraron el final del siglo XX— para volver a recuperar su primacía cuando las exigencias sanitarias son desplazadas a planos secundarios. Cabe afirmar que esta es la situación que se viene constatando en los últimos cinco años, como luego ilustraremos con ejemplos concretos.

  Procede, en todo caso, señalar que en esas "coordenadas ambientales" de la Europa de la Libre Circulación de Mercancías se ha generado la mayor parte de la legislación alimentaria al uso, y que el efecto revulsivo de las crisis de finales del XX, antes citadas, dio lugar a un cambio conceptual, plasmado en el Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria (2.000), con efectos indudablemente muy positivos que más adelante analizaremos, al igual que algunos elementos que ponen de manifiesto un relajación preocupante del espíritu del Libro Blanco.

- El principio de subsidiariedad y su pretendido "sinónimo", de complementariedad: La UE sólo legislará cuando una acción comunitaria arroje mayor valor añadido que la suma de acciones normativas equivalentes de los Estados miembros en una materia dada. Otra forma de enunciarlo (la complementariedad propiamente dicha) es que la UE legislará allá donde los Estados miembros no puedan llegar con sus ini-

ciativas nacionales. Aun cargados de lógica, estos Principios han servido, en ocasiones, como excusa o como rémora para poder contar con un marco legal alimentario en la Comunidad que responda a las premisas básicas —que más adelante se detallan— de cualquier ordenamiento alimentario: Completo y actualizado. Al amparo del Principio de Subsidiariedad hemos padecido retrasos graves en algunos ámbitos de armonización. El caso de la normativa en materia de alimentos destinados a regímenes especiales, es paradigmático.

- Las imperfecciones en la técnica normativa o, sin ambages, la escasa calidad de la normativa comunitaria en algunos de sus Actos. A título de ejemplo, baste citar la Directiva 2004/41/CE (las referencias a las normas derogadas del art. 2 se entenderán hechas a, "según lo requiera el contexto" a Reglamentos no identificados); Los Reglamentos de Higiene y su colisión con Reglamentos de comercialización (la evisceración de aves, como ejemplo); Normas aprobadas por Directiva y modificadas por Reglamento; Correcciones de errores que suplantan las fechas de publicación (Rglto. 1924/2006 sobre Declaraciones nutricionales y propiedades saludables, o Rglto. de la Comisión sobre etiquetado de alimentos que contienen gluten.

4.3. El Codex Alimentarius

Hay otras referencias que no cabe desconocer ni descuidar, pues incluso permiten indirectamente, influenciar iniciativas y contenidos en el ámbito comunitario: Nos referimos a las Normas (Normas de Estandarización y Códigos de Prácticas Recomendados) del Codex Alimentarius. El Codex Alimentarius (antes Codex Alimentarius Mundi) es un Programa conjunto FAO/OMS de Normas Alimentarias, que agrupa a más de 160 Países miembros. Es internacional, pero no goza de supranacionalidad. A diferencia de lo acontecido con la UE, no hemos cedido soberanía normativa al Codex. Sus actos, sus normas, no tienen eficacia jurídica directa…en principio, ya que a partir del Acuerdo de Marrakech, la Organización Mundial de Comercio decide que las Normas Codex sean el instrumento válido para dirimir conflictos bilaterales o multilaterales. En otras palabras. Los Acuerdos de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias, y de Obstáculos Técnicos al Comercio, se gestionan con la producción normativa del Codex. Ni la UE ni sus Estados miembros deben volver la espalda a esa realidad, máxime cuando nuestro comercio internacional de productos alimenticios no se limita al Espacio económico Europeo, ni puede siempre regirse y gestionarse por dispo-

siciones comunitarias pues, pese a todo y a todos, aún hay carencias sustantivas notables en la legislación alimentaria de la UE.

5. MARCO LEGAL ALIMENTARIO

5.1. Marco Legal Deseable, Consecuencias Prácticas de un Marco Mal Orientado

De una u otra forma, los países ordenan sus reglas de gestión en materia alimentaria en un marco particular, encuadrado en el Ordenamiento interno pero con unas peculiaridades que las diferencian de otros cuerpos legales. Resaltaríamos quizá la ineludible necesidad de sustentar tales reglas en la mejor evidencia científica, diseñarlas en una conjugación adecuada de intereses imperativos y, sobre todo, establecer mecanismos de actualización permanente.

Un Marco Legal Alimentario ha de ser, por tanto, completo, actualizado, basado en la mejor evidencia científica, equiparable al de los países de entorno y desarrollo análogos, y respetuoso con el conjunto de exigencias imperativas (protección de la salud, del derecho a la información, respeto medioambiental, lealtad en las transacciones comerciales).

Durante años ha prevalecido la tendencia de legislar pensando de forma casi exclusiva en el producto final, y no en el proceso en su conjunto. Esta legislación finalista no puede servir como base adecuada a una prevención real.

El control del cumplimiento de una normativa así concebida nos llevará antes (y de forma casi exclusiva) a constatar que a prevenir. Esta orientación, unida en ocasiones a un sesgo notable en el reparto equitativo de responsabilidades Administrador/Administrado, a una excesiva tendencia a la sectorialización o "verticalidad" y a un exceso de positivismo, derecho napoleónico, que se plasma en la regulación del detalle, en el exceso de especificaciones técnicas, en la prolijidad…no se ha demostrado como el mejor instrumento para sustentar el control de inocuidad que ciudadanos, agentes de control y agentes económicos necesitan.

5.2. Reacciones y sus causas frente a un marco legal inadecuado. El "Nuevo Enfoque"

Cuando la UE (entonces CEE) desde su condición de supranacionalidad, se ha convertido ya en la fuente prevalente de iniciativas normativas, y ya abocan-

do la llegada del Libro Blanco del Mercado Interior, las Instituciones Comunitarias concluyen que la prolificidad de Actos no ha mejorado las dificultades a la libre circulación de mercancías en el Mercado Único, que debía ser un hecho en 1992. El papel "soberano" en la práctica ha pasado de los legisladores (Consejo, Comisión) al Tribunal de Justicia, y sólo la abundante clarificación jurisprudencial permitió en cierta medida conseguir los efectos que los esfuerzos de armonización no alcanzaban para llegar a instaurar un Mercado Único en el que no sólo las llamadas "cuatro libertades" (Capitales, Personas, Servicios y Mercancías), sino las exigencias imperativas, con la protección de la salud a la cabeza, resultasen razonablemente salvaguardadas.

Del análisis de tal "fracaso" se concluyen numerosos elementos, hasta para sentar las bases de la primera modificación de los Tratados fundacionales mediante el Acta Única Europea. Sin embargo, nos interesa destacar lo que se dio en llamar "La Nouvelle Approche", el "Nuevo Enfoque", como declaración de principios hacia una nueva forma de legislar y armonizar. El Primer Elemento de la "NA" se centró en el Marco legal, estableciendo la conveniencia de legislar…

- En los ámbitos necesarios.
- Dando predominio a la normativa horizontal sobre la vertical.
- Con el menor número posible de actos normativos.
- Haciendo prevalecer objetivos sobre medios (*).
- Regulando sólo lo esencial y
- Remitiendo el resto al marco voluntario, a instrumentos de normalización.

El Segundo Elemento se centró en la Evaluación de Conformidad:

- Al servicio de la Equivalencia de Controles.
- Para evaluar la conformidad según procedimientos transparentes, fiables, que garanticen la calidad de los resultados.
- Poniendo de manifiesto la necesidad de crear instrumentos para generar confianza en la evaluación de conformidad.

(*) Equivalía a dar preponderancia a la forma Directiva sobre la forma Reglamento. Con el transcurso de los años, constatados los desfases que los procesos de armonización llevados a cabo por los distintos Estados miembros generaban en la armonización, se constata hoy un retorno decidido a la forma Reglamento.

Aunque la "Nouvelle Aproche" nace fundamentalmente en el mundo de los productos industriales, sus principios, que posteriormente inspiraron en gran medida algunas de las modificaciones conceptuales recogidas en el Acta Única Europea, resultan de plena aplicación en la legislación alimentaria.

No obstante, hicieron falta 15 años y una gran crisis de confianza en el control y consumo de alimentos para que tales principios impregnasen la legislación alimentaria de la UE y, por ende, de sus Estados miembros.

Es a partir del Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria cuando empezamos a reconocer una maquinaria normativa preocupada por evitar lagunas, solapamientos y obsolescencias; un marco legal con un claro enfoque transversal y tendente a una menor sectorialización; unos Actos que se van descargando de especificaciones técnicas en la medida de lo posible, y que buscan complementariedad en la normalización; una tendencia —ciertamente no siempre respetada a huir de la prolificidad a favor de un número de Disposiciones más abordable; un conjunto de preceptos que sólo cobra verdadero contenido si es susceptible de ser controlado mediante procedimientos homogéneos, comparables y de calidad objetivamente contrastada…

No obstante, la consecución de esos objetivos ha necesitado varios años en cuyo transcurso la Legislación Comunitaria ha debido enfrentar y resolver —no siempre con éxito— muy diversos problemas, derivados en ocasiones de sus propias herramientas de gestión al servicio de la consecución de un gran Mercado sin Fronteras.

5.3. Identidad y equivalencia normativa: Principio de Reconocimiento Mutuo vs Principio de Confianza Mutua. Coexistencia Normas armonizadas/Normas nacionales

El reto de mantener un marco legal completo y actualizado difícilmente se plasma de verdad en una armonización total. El principio de subsidiariedad (acción comunitaria sólo allí donde una acción común suponga un valor añadido al conjunto de normas nacionales) pude actuar positiva o negativamente. La coexistencia de normas nacionales pretendidamente equivalentes —los Procedimientos de Notificación velarán por ello— sólo cabe desde el Principio de Reconocimiento Mutuo. No obstante, ni tan siquiera la plena armonización de un determinado ámbito asegura en la práctica el Principio de Confianza Mutua: Todos aplican idénticas normas con idéntico celo. El resultado, es la desconfianza, las trabas técnicas a la libre circulación…porque quizá la legisla-

ción no se gestó verdaderamente al servicio de la equivalencia de los controles de conformidad…

5.4. Génesis de la legislación armonizada: Unicidad de Institución-Multiplicidad de Legisladores. Distintos perfiles: Armonización Sectorial Veterinaria vs Legislación Industrial. Consecuencias prácticas

También hemos venido asistiendo a una falla importantísima en la génesis de la Legislación Armonizada que, en cualquier caso —sea por aplicabilidad directa o mediante transposición— configura el desarrollo de los códigos alimentarios de los países.

Aunque según la doctrina de Unicidad de las Instituciones Comunitarias, la Comisión Europea (con poder de iniciativa en la elaboración de normas) es Una, lo cierto es que cada una de sus Direcciones Generales —al menos en el ámbito alimentario que nos afecta— legisló con criterios distintos.

Ha sido palpable la diferencia entre la llamada "legislación de productos industriales" o de "Mercado Interior", promovida desde la antigua DG III (Mercado Interior, hoy "Empresa"), y la metodología y orientación seguida por la DG VI, Agricultura, en la armonización sectorial veterinaria. Dos filosofías casi inmiscibles, tanto por las fases de la cadena alimentaria en las que cada una se interesa, como por el choque entre las tendencias horizontalistas y casi desreguladoras de la DG III y la prolijidad positivista y exceso de sectorialización de los proyectos dimanantes de la DG VI. Eso, sin profundizar aquí y ahora en la disfunción derivada de tratar en un foro de corte económico, de clara inspiración "P.A.C." (la DG Agricultura) aspectos sanitarios que no se han equilibrado adecuadamente frente a un enfoque esencialmente economicista…

6. NUEVA ORIENTACIÓN NORMATIVA EN SEGURIDAD ALIMENTARIA

El "Libro Verde de la Legislación Alimentaria", casi sin consecuencias prácticas, supuso un primer intento serio de revisar los defectos de la Armonización en materia alimentaria, pero arrastrando el sesgo economicista en muchos as-

pectos. Fueron las crisis alimentarias (BSE, Dioxinas), coincidentes con una moción de censura y un tránsito vertiginoso de la "Comisión Santer" a la "Comisión Prodi" las que condujeron a la propuesta y adopción de otra serie de medidas de revisión, siendo quizá el "Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria" la base de la evolución y del status actual.

6.1. Orientación Normativa de COMEUR/SANCO: Del Libro Blanco al Reglamento 178/2002. El Principio de Precaución y su doctrina de aplicación

El LBSA es una Comunicación de la Comisión Europea, publicada en el 2000. Como tal Comunicación no tiene carácter vinculante, y carece de eficacia jurídica, por lo que el asentamiento de los principios que contiene y su aplicación real precisaron de la aprobación de un Acto vinculante que los recogiese: **El Reglamento 178/2002*, por el que se establecen los Principios y Requisitos Generales de la Legislación Alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la Seguridad Alimentaria.***

Dicho Reglamento, herramienta necesaria para dar fuerza legal al LBSA, no hubiera existido en su actual redacción sin la Comunicación precedente. Por ello, y porque a nuestro juicio el LBSA, junto con la reorganización estructural de la Comisión Europea, constituye el punto de inflexión en la forma de legislar y actuar en Seguridad Alimentaria, dedicaremos unas líneas a analizarlo, aunque no sea, en sí, un Acto normativo aplicable.

El LBSA es un compromiso conceptual y cronológico resultante de un análisis objetivo de la situación creada en la UE a consecuencia de la concatenación de varias crisis alimentarias al final de la década de los 90'. Identifica errores y, en un alarde de mentalidad científica no se detiene en el "qué", sino que busca el "por qué", así como las soluciones a las deficiencias detectadas. Todas sus propuestas responden a deficiencias y carencias detectadas en el análisis de situación llevado a cabo en el seno de la UE.

En lo conceptual, el LBSA reconoce la necesidad de generar y garantizar la Seguridad Alimentaria en todas y cada una de las fases de la cadena alimentaria, que no cabe considerar inconexas ni gestionadas desde un cartesianismo que no responde a la realidad. De ahí surge la máxima, ya acuñada pero no siempre llevada a la práctica, "De la Granja a la Mesa".

Sostiene que las políticas de seguridad alimentaria se fundamenten en la triada del Análisis de Riesgos del Codex Alimentarius: Evaluación, Gestión y Comunicación. Y en este contexto, incide en la necesidad de que cualquier medida de gestión del riesgo se fundamente en una evaluación previa adecuada y suficiente, previendo mecanismos para aquellos casos en los que el estado de la ciencia no permite una evaluación completa de los riesgos alimentarios. Sienta, por tanto, las bases, del Principio de Precaución.

Aboga por un sistema equitativo de distribución de responsabilidades en la génesis y tutela de la seguridad alimentaria. Establece con claridad que la seguridad alimentaria debe ser generada por los operadores económicos, mediante herramientas bien concretas (trazabilidad y autocontrol basado en APPCC), en tanto que los agentes de control oficial deben tutelar la seguridad obtenida y reconducirla cuando sea necesario.

Introduce criterios de calidad, no ya en los procesos alimentarios, sino en el propio ejercicio del control: Auditorías al servicio de la constatación de la calidad de los controles y, con ello, de su comparabilidad y fiabilidad.

Hablamos también de un compromiso cronológico, "de agenda", porque el LBSA reconoce la necesidad de colmar vacíos legales y actualizar normas obsoletas no basadas en la evidencia científica. Pero se compromete a llevarlo a cabo mediante un ambicioso paquete de medidas normativas a ejecutar en tiempos bien determinados.

Casi coincidiendo en el tiempo con el LBSA, la Comisión presentó su ***Comunicación relativa al Principio de Precaución***, en un intento de propiciar un marco de legalidad a las actuaciones de salvaguarda, cada vez más frecuentes, que los Estados miembros tendían a adoptar ante la presunta insuficiencia de la normativa existente, derivada a su vez de carencias más o menos objetivables en la evaluación de los riesgos. Es preciso señalar que el Principio de Precaución sólo se vió reflejado en un acto normativo vinculante cuando se aprobó, con posterioridad a la Comunicación, el Reglamento 178/2002, que contempla el "Principio de Cautela en su artículo 7, y al que nos referiremos más adelante al analizar las bases legales de la gestión instrumental del riesgo alimentario.

Con esta Comunicación se sientan también las bases para ordenar dichas actuaciones, alejándolas de la desproporción y de la arbitrariedad. Aunque, ciertamente, hay muchas lecturas en torno al concepto "Principio de Precaución", y la Comunicación resulta harto corta en ese sentido. Algunas iniciativas nacionales presentadas en otros foros ("Aplicación del Principio de Precaución", presentada por España en la 22ª Sesión del Comité Coordinador del Codex Alimen-

tarius para la Región Europea, octubre 2000) vinieron a clarificar algunos aspectos prácticos en torno al cuándo/por qué/cómo del recurso al Pº de Precaución, pero nunca revirtieron al ámbito de la UE.

Todos estos elementos han venido perfilando la situación actual y su previsible futuro.

El primer resultado patente del "LBSA" no es tanto el cumplimiento forzado de un calendario de desarrollo normativo orientado a actualizar lo existente y colmar las lagunas de lo hasta ahora inabordado. Quizá el mejor resultado, tanto como legislación como en cuanto a su valor doctrinal, es el ***Reglamento 178/2002, por el que se establecen los Principios y Requisitos Generales de la Legislación Alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la Seguridad Alimentaria.***

Tanto el LBSA como el Regltº 178/2002 asientan el Análisis de Riesgos como bases de las políticas de seguridad alimentaria, lo que supone entender la legislación alimentaria como un ejercicio de Gestión de Riesgos que, necesariamente, ha de basarse en la evidencia científica que le proporciona la previa Evaluación de dichos Riesgos.

Más causalidad que coyuntura es la remodelación de la Comisión al servicio de esta filosofía, con la creación de una Dirección de Salud y Protección de los Consumidores que legisle y gestione la Seguridad Alimentaria desde esta óptica y, por supuesto, con un posicionamiento drástico para que la legislación en materia de inocuidad no se promueva desde foros "PAC".

Son claras las tendencias de hacer prevalecer la horizontalidad sobre la sectorialidad, optando en ocasiones por la integración de disposiciones sectoriales en grandes marcos horizontales. El llamado "Paquete Higiene" fue un ejemplo palmario.

No obstante, aún han de coexistir normas de viejo cuño con otras de reciente factura, por lo que resulta difícil, muchas veces, trazar la frontera entre dos filosofías de producción normativa que, en ocasiones, más que complementarias, han sido antagónicas.

Resulta más sencillo diferenciar las disposiciones sustantivas de las puramente instrumentales, al servicio de la aplicación de las primeras. La pretensión de orientar dichas normas instrumentales al servicio del control de la conformidad, de la equivalencia de controles, resulta tanto más practicable cuanto mejor diseñadas estén las normas sustantivas, de acuerdo con los principios enunciados.

Como se ha comentado en apartados precedentes, España, los Estados miembros de la UE, ven supeditado su marco legal alimentario a la dinámica

Comunitaria, a casi todos los efectos. Cada vez es menor el espacio (y quizá la necesidad) para las iniciativas internas, aunque siempre existirán.

7. ACTUALIDAD Y FUTURO

Sobre la base de todo lo expuesto, cabe afirmar que el presente y el futuro han quedado definitivamente marcados por los cambios conceptuales, estructurales y programáticos que las "grandes crisis alimentarias" de finales del siglo XX impusieron en la legislación comunitaria y en su enfoque y conceptualización, así como en las propias estructuras de la Comisión Europea, el "legislador comunitario".

7.1. El Reglamento 178/2002, por el que se establecen los Principios y Requisitos Generales de la Legislación Alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la Seguridad Alimentaria

Nos hemos referido a este Acto en su faceta acaso más importante: Dotar de eficacia jurídica e incorporar al ordenamiento alimentario comunitario los Principios del Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria. No obstante, procede resaltar algunos aspectos relevantes fruto de su aprobación:

- Sirve de base común a un paquete normativo trascendental, como es el "Paquete Higiene".
- Incorpora un importante conjunto de definiciones y aproximaciones conceptuales comunes a todos los textos comunitarios de legislación alimentaria, redundando a favor de la uniformidad y economía normativas.
- Supone una clara señal a favor de la protección del consumidor frente a la libre circulación de mercancías.
- Comprende la única base legal existente en el marco alimentario para el Principio de Precaución o Cautela.
- Establece condiciones generales de seguridad alimentaria para el comercio intracomunitario y para el internacional con Países terceros.

- Clarifica las obligaciones y responsabilidades de los agentes de control y los agentes económicos ("explotadores de empresas de alimentos y piensos").
- Incorpora, por vez primera, la exigencia de Trazabilidad en el conjunto de la cadena.
- Ampara legalmente la constitución y reglas de funcionamiento del que podríamos llamar "evaluador" del riesgos centralizado para el conjunto de la UE: La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, en su acrónimo inglés).
- Comprende la base legal única para los sistemas de alerta rápida para alimentos y piensos.
- Establece las adaptaciones instrumentales necesarias para la consideración integral, "de la granja a la mesa", de la cadena alimentaria, y en todo momento se refiere tanto a alimentos destinados al consumo humano como a los destinados a animales de abasto, "piensos". Reconvierte el Comité Permanente de Productos Alimentarios en Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y Sanidad Animal.
- Se aprueba para que sirva de base conceptual a toda la legislación alimentaria ulterior.

7.2. Las herramientas de gestión instrumental que competen al agente económico de la cadena alimentaria

El Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria y el Reglamento 178/2002, *por el que se establecen los Principios y Requisitos Generales de la Legislación Alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan Procedimientos relativos a la Seguridad Alimentaria* incorporan, además, el **Principio de la distribución equitativa de las responsabilidades entre los agentes de control y los agentes económicos**. Una consecuencia directa de la mencionada distribución equitativa de responsabilidades es la obligación del agente económico, recogida en los Reglamentos 178/02 y 852/04 de generar seguridad: El operador económico de la cadena alimentaria es responsable de la seguridad de los productos que pone en el mercado. Pero debe generar esa seguridad utilizando herramientas instrumentales concretas: L**a Trazabilidad integral de la Cadena Alimentaria** (R 178/2002) y **los Sistemas de Autocontrol basados en el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC)** del Codex Alimentarius (R 852/2004).

7.3. El "Paquete" de Reglamentos de Higiene como paradigma de extensión e integración

El espíritu que presidió la tramitación del "Paquete Higiene" y sus primeros desarrollos ha sido casi fugaz, pues una vez postergados a un segundo plano (¿por cuánto tiempo?) los temores a las crisis alimentarias, la balanza vuelve a inclinarse hacia la prevalencia de la libre circulación de mercancías, en detrimento de unas garantías sanitarias que, pese a todo, la sociedad sigue demandando.

En cualquier caso, debe reconocerse el "Paquete" de Reglamentos de Higiene como el más acertado paradigma de extensión —"del campo a la mesa"— e integración —lo transversal y lo sectorial—.

El llamado "paquete Higiene", integrado por un conjunto de Reglamentos y Directivas que luego detallaremos, no es más que el ejemplo palmario de desarrollo coherente del Reglamento 178/2002 y, en definitiva, de los Principios contenidos en el Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria.

Desbordaría las posibilidades del presente capítulo tratar de analizar de forma exhaustiva los contenidos de este "paquete" y lo que ha supuesto de innovador. Cabe, en todo caso, resaltar algunos elementos clave en este ejercicio normativo trascendental para la seguridad alimentaria:

- Política de Higiene transparente y única para todos los alimentos y todos los operadores del sector alimentario a través de toda la cadena, "de la granja a la mesa.
- Horizontalidad, integrando toda la cadena alimentaria, desde el campo a la mesa, alimentos y piensos.
- Establecimiento de exigencias de higiene/inocuidad más allá de los alimentos de origen animal.
- Integración en un cuerpo único, bajo el Reglamento General 852/2004 (y todos, a su vez, bajo el 178/2002), de las antiguas directivas de armonización sectorial veterinaria.
- Fusión, armonización y simplificación de requisitos de la primitiva Directiva de Higiene, 93/43/CE. Consolidación de algunas especificaciones y eliminación de otras prescindibles, en un espíritu desregulador que persigue antes los objetivos que los medios. Retrocede el positivismo.
- Consideración de riesgos específicos vinculados a categorías concretas de alimentos.

- Afianzamiento del principio de equidad en la distribución de responsabilidades entre agentes de control oficial y agentes económicos. Las empresas aplican, mantienen y revisan procedimientos adecuados de seguridad alimentaria: APPCC obligatorio salvo en la producción primaria. Potencia el papel de las Guías de Prácticas Correctas de Higiene.
- Flexibilidad.

Tampoco cabe ignorar que esta tarea hubiera quedado incompleta sin un **Reglamento tan coherente como el 882/2004,** que analizaremos más adelante: **Unas reglas comunes de control de la conformidad**. Coherente, por una parte porque es la base legal para el control de los alimentos y los piensos en toda la cadena alimentaria; y por otra, porque incorpora el principio de la distribución equitativa de las responsabilidades entre los agentes de control y los agentes económicos, poniendo el acento en los aspectos cualitativos del ejercicio del control de conformidad frente a los cuantitativos, que habían imperado tradicionalmente. De ahí la obligatoriedad de la figura de las auditorías para asegurar tanto el ejercicio del control como su calidad.

En línea con la mencionada distribución equitativa de responsabilidades está la obligación, recogida en los Reglamentos 178/02 y 852/04 de generar seguridad con herramientas concretas, como la trazabilidad y los sistemas de autocontrol basados en el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control del Codex Alimentarius. Sin embargo, estas exigencias, particularmente la del **autocontrol basado en APPCC** se han ido relativizando poco a poco, al amparo de la presunta incapacidad de las Pymes para incorporar esta metodología. Una discusión aún en curso, que entraña confusiones peligrosas entre versatilidad y flexibilidad. Sólo la Producción Primaria y las llamadas "operaciones conexas" a la Producción Primaria quedaron exentas de la obligatoriedad de aplicar Autocontrol basado en APPCC, sustituyéndolo por las Guías de Buenas Prácticas, instrumentos complementarios para otras fases de la cadena y herramienta única en la fase de la producción primaria. Esta condición, razonable en aquél momento, fue aprobada por el Consejo UE —con reticencias por parte de algún Estado miembro— y se dejó a consideración futura la posibilidad de incorporar esa exigencia a todos los eslabones de la cadena alimentaria.

Los **Reglamentos de Higiene requerían un desarrollo, tanto armonizador como a base de iniciativas nacionales,** de Derecho Interno, para regular cuestiones que, en virtud del Pº de Subsidiariedad deben quedar a los Estados miembros. En el caso de España se optó por regular lo relativo al Registro Sanitario, el comercio "al detall" y la reordenación de los mataderos "de produc-

ción y difusión limitadas" o, lo que es lo mismo, el concepto de distribución local y, más recientemente, ***la Información sobre la cadena alimentaria que debe acompañar a los animales destinados a sacrificio (RD 361/2009)***. En ocasiones, más que hablar de un desarrollo —que se ha dado, y en algunos casos para "renegociar a la baja" preceptos y calendarios de los mencionados Reglamentos— cabría hablar de Actos complementarios a los Reglamentos de Higiene y, con posterioridad, de actualización.

El "paquete Higiene" original quedó constituido por los siguientes Actos:

- *Reglamento (CE) 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios.*
- *Reglamento (CE) 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.*
- *Reglamento (CE) 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados a consumo humano.*
- *En necesaria conjunción con estos Reglamentos, habría que considerar una Directiva instrumental, la 2004/41/CE, que deroga todos los elementos del marco precedente que colisionarían con los nuevos Reglamentos.*
- *Como complemento imprescindible al "Paquete Higiene":*
- *Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales.*

Como normas de desarrollo y aplicación:

- *Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.*
- *Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2005, por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y para la organización de controles oficiales con arreglo a lo dispuesto en los Reglamentos (CE) nº 854/2004*

del Parlamento Europeo y del Consejo y (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, se introducen excepciones a lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifican los Reglamentos (CE) nº 853/2004 y (CE) nº 854/2004.

- *Reglamento (CE) nº 2075/2005 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2005, por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne.*
- *Reglamento (CE) nº 2076/2005 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2005, por el que se establecen disposiciones transitorias para la aplicación de los Reglamentos (CE) nº 853/2004, (CE) nº 854/2004 y (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifican los Reglamentos (CE) nº 853/2004 y (CE) nº 854/2004.*

Y, como actualizaciones más recientes:

- *Reglamento 852/04* ***modificado en último lugar por el Reglamento (CE) nº 1019/2008.***
- *Reglamento 853/04* ***modificado en último lugar por el Reglamento (CE) nº 1020/2008.***
- *Reglamento 854/04* ***modificado en último lugar por el Reglamento (CE) nº 1021/2008.***

En fechas recientes se ha dado a conocer el primer Informe sobre la aplicación del "Paquete Higiene". El artículo 16 del Reglamento (CE) nº 852/2004, el artículo 14 del Reglamento (CE) nº 853/2004 y el artículo 21 del Reglamento (CE) nº 854/2004 exigen a la Comisión que presente al Parlamento Europeo y al Consejo, no más tarde del 20 de mayo de 2009, un informe en el que se pase revista a la experiencia adquirida con la aplicación de estos reglamentos, acompañado, si procede, de las propuestas pertinentes. Además, el Reglamento (CE) nº 852/2004 exige a la Comisión que estudie si es deseable y viable la ampliación de los requisitos relativos al Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) a los explotadores de empresas alimentarias del ámbito de la producción primaria.

El ***INFORME DE LA COMISIÓN AL CONSEJO Y AL PARLAMENTO EUROPEO sobre la experiencia adquirida con la aplicación de los Reglamentos (CE) nos 852/2004, 853/2004 y 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativos a la higiene*** [COM(2009) 403 final] fue publicado el 28.7.2009, con conclusiones razonablemente alentadoras, si

bien dicho Informe no analiza algunos aspectos que, a nuestro juicio, han supuesto un cierto alejamiento de los compromisos iniciales.

7.4. ZOONOSIS: EVOLUCIÓN PARALELA

El influjo del Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria y del Reglamento 178/2002 (ciertamente, en un contexto geográfico y temporal de preocupación por las crisis alimentarias y los patógenos reemergentes) también se constata en la actividad normativa para la vigilancia y control en materia de zoonosis de transmisión alimentaria. En España, *la Ley 8/2003, de sanidad animal* **y en el** *Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades animales,* **establecen programas de lucha frente a enfermedades animales, pero sólo los relativos a tuberculosis y brucelosis, de transmisión alimentaria, tienen interés en este marco.**

El impulso normativo fundamental procede de la UE que, por una parte, aprueba la ***Directiva 2003/99/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos***, (incorporada al Derecho español mediante el ***Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos***) y, por otra, en cumplimiento del artículo 9 de la mencionada Directiva, elabora, con periodicidad anual, los ***Informes de Fuentes y Tendencias***. Estos ofrecen un diagnóstico de situación, así como de la eficacia de las medidas de control y erradicación que se van adoptando frente a los principales agentes zoonóticos de transmisión alimentaria. Sobre la base de la legislación mencionada, la UE establece un procedimiento estandarizado, secuencial, para los distintos agentes zoonóticos, que consta de las siguientes fases: Determinación de la prevalencia del agente de que se trate en la población animal elegida, determinación de un objetivo de reducción de la prevalencia y elaboración/aprobación de programas de control, específicos para cada Estado miembro. Tanto los objetivos de reducción de prevalencia como los Programas son aprobados mediante actos vinculantes.

Los agentes zoonóticos de mayor prevalencia, como es el caso de ***Salmonella***, han precisado de Actos adicionales para reforzar su vigilancia y control, como el *Reglamento (CE) Nº 2160/2003,* ***del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre control de la Salmonella y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos***. Como su propia denominación indica, estable-

cen un marco de trabajo para un agente concreto, pero quedan abiertos a su aplicación frente a otros agentes zoonóticos.

A título de ejemplo, en el caso de *Salmonella* en ponedoras, el estudio de referencia sobre la prevalencia se aprobó por Decisión 2004/665/CE de la Comisión, de 22 de septiembre de 2004, relativa a un estudio de referencia sobre la prevalencia de *Salmonella* en las manadas de aves ponedoras de la especie *Gallus gallus*; el objetivo de reducción, por el Reglamento (CE) Nº 1168/2006 de la Comisión, de 31 de julio de 2006 por el que se aplica el Reglamento (CE) Nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto al objetivo comunitario de reducción de la prevalencia de determinados serotipos de salmonela en las gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus* y se modifica el Reglamento (CE) nº 1003/2005. Y los programas nacionales de control mediante la Decisión 2007/848/CE de la Comisión, de 11 de diciembre de 2007 por la que se aprueban determinados programas nacionales para el control de la salmonela en manadas de gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus*.

También la UE ha desempeñado un papel trascendental en cuanto a la normativa en materia de **Encefalopatías Espongiformes Transmisibles**. Tras la constatación de la capacidad del prión ovino de traspasar la barrera interespecífica y ocasionar la EET en bovino y, de éste, a la especie humana, la Unión Europea adoptó diversas medidas de protección frente a la Encefalopatías Espongiformes Transmisibles, que comenzaron con la limitación o prohibición de comercialización de productos de vacuno del Reino Unido y de Portugal, llegando posteriormente a la aprobación del **Reglamento (CE) 999/2001**, ***por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles***.

Ante la aparición del primer caso de EEB en España (noviembre de 2000), se aprobó el **Real Decreto 3454/2000**, ***por el que se establece un Programa Integral Coordinado de Vigilancia y Control de las EET de los animales***, acorde y complementario al Reglamento (CE) 999/2001, pudiendo afirmarse que esta Norma establece las bases de la vigilancia activa de las EETs. El ***Reglamento (CE) 36/200*5** estableció la ***estrategia de vigilancia epidemiológica de EETs en pequeños rumiantes.***

Las medidas se actualizan en función de la evidencia científica en la evaluación del riesgo de infectividad y de la evolución de los datos epidemoepizootiológicos, constituyéndose así una ***"Hoja de ruta para las EETs"*** en la que se programan las medidas a adoptar en función de la evolución mencionada.

7.5. El *Acquis Communautaire:* Progreso en otras áreas

Si han sido las facetas de la Higiene y del Control las que se han desarrollado de forma más novedosa al amparo de los principios del Libro Blanco, **no cabe hablar de falta de progreso en otras áreas,** aunque éstas, procedentes en su mayoría de la maquinaria legislativa de la antigua Dirección de Mercado Interior, necesitaban quizá menos "aggiornamento" conceptual que las Directivas de armonización sectorial veterinaria. En cualquier caso, además de precisar de la inevitable adaptación al progreso técnico, que en mayor o menor grado ha experimentado, debían alcanzarse otros objetivos, como son la sistematización, un avance hacia la transversalidad, la fundamentación más rigurosa en bases científicas y la accesibilidad para los agentes económicos y consumidores. Casi todas las categorías han evolucionado persiguiendo algunos de estos objetivos, y describiremos someramente los casos más relevantes.

7.5.1. Legislación en materia de Residuos zoosanitarios y fitosanitarios

La armonización en materia de ZOOSANITARIOS se regula fundamentalmente en el ***Reglamento (CE) Nº 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos (LMR) de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) Nº 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) Nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo.***

La base que inspira el sistema de armonización de los zoosanitarios se fundamentó en ***la Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE (Diario Oficial n° L 125 de 23/05/1996 p. 0010-0032)***.

El sistema resultaría incompleto si no se hubiesen establecido directrices de obligado cumplimiento para la toma de muestras, el análisis y la "performance" de los laboratorios dedicados a esta faceta del control oficial:

La Decisión de la Comisión 97/747/CE: de 27 de octubre de 1997, por la que se fijan los niveles y frecuencias de muestreo previstas en la Directiva 96/23/CE del Consejo, con vistas al control de determinadas sustancias y sus

residuos en determinados productos animales (Texto pertinente a los fines del EEE) Diario Oficial n° L 303 de 06/11/1997 p. 0012-0015.

Entre los avances específicos en esta materia (y con la particularidad del papel relevante jugado por España en su aprobación) citaremos el ***Reglamento (CE) 124/2009 de la Comisión, de 10 de febrero de 2009, que establece los contenidos máximos de coccidiostáticos e histomonóstatos presentes en los alimentos como resultado de la transferencia inevitable de estas sustancias en los piensos a los que no están destinados.*** Y dentro de la especificidad, con especiales connotaciones en materia de control oficial y protección de la salud frente a los fraudes con potenciales consecuencias sanitarias, en el ámbito del Ordenamiento Español procede mencionar el ***Real Decreto 562/2009, de 8 de abril, por el que se modifica el Real Decreto 2178/2004, de 12 de noviembre, por el que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas de uso en la cría de ganado.***

En materia de **FITOSANITARIOS,** la tendencia evoluciona hacia la armonización total, dejando cada vez menos opciones a las legislaciones nacionales. El ***Reglamento 396/2005, de 23 de Febrero de 2005, del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/141/CEE del Consejo*** es el instrumento de referencia. Modificado en última instancia por el ***Reglamento (CE) 1050/2009, de la Comisión, de 28 de octubre de 2009, por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) 396/2005 (…)*** (Se publicará en breve un corrigendum).

Entre las DISPOSICIONES COMUNITARIAS DE DIRECTA APLICACIÓN orientadas a garantizar la uniformidad del Control Oficial de los LMR de Fitosanitarios, resaltamos:

Reglamento (CE) 901/2009 de la Comisión de 28 de septiembre de 2009 relativo a un programa comunitario plurianual coordinado de control para 2010, 2011 y 2012 destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal o sobre los mismos, así como a evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos.

Reglamento 1213/2008 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2008, relativo a un programa comunitario plurianual coordinado de control para 2009, 2010 y 2011 destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal o sobre los

mismos, así como a evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos.

Recomendación 2008/103/CE, de 4 de Febrero de 2008, relativa a un programa comunitario coordinado de control para 2008, destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los cereales y en determinados productos de origen vegetal, así como a los programas nacionales de control para 2009.

Y en el ámbito de las DISPOSICIONES NACIONALES:

Real Decreto 290/2003, de 7 de Marzo de 2003, por el que se establecen los métodos de muestreo para el control de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal (B.O.E. 08.03.2003).

Real Decreto 867/2008, de 23 de Mayo de 2008, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación (B.O.E. 23.05.2008).

7.5.2. Armonización de aditivos

Desde 1989 la armonización comunitaria de aditivos empezó su orientación hacia la transversalidad, renunciando a la recoriaización a ultranza que había venido presidiendo la legislación en la materia, tanto en la UE como en sus EEmm. Se optó por el establecimiento de unos extensos principios genarales, en una Directiva "Marco", la 89/107/CEE, para proceder sobre esa base a una armonización de los **COLORANTES (Dtva 94/35/CE), los EDULCORANTES (Dtva 94/36/CE y los aditivos distintos de colorantes y edulcorantes, "MISCELÁNEA" (Dtva 95/2/CE).**

Para cada una de esas grandes categorías se establecían y actualizaban los **CRITERIOS DE IDENTIDAD Y PUREZA.**

Este enfoque de transversalidad sigue siendo plenamente válido, si bien la atribución de dosis y empleos cada día se fundamenta más en la evidencia científica (estudios de ingesta), y la mencionada Directiva "marco" 89/107 ha sido sustituida por un Reglamento **(Reglamento (CE) del PE y del Consejo nº 1333/2008, sobre aditivos alimentarios)** que incorpora preceptos y exigencias que anteriormente se regulaban, en todo o en parte, en las directivas transversales de colorantes, educlcorantes y "misceláneos".

Las adaptaciones al progreso técnico y actualizaciones quedan reguladas por los preceptos del nuevo Reglamento "marco", y se mantienen los trabajos para fijar condiciones de **Identidad y Pureza,** siendo ejemplos recientes el ***Real Decreto 1466/2009, de 18 de septiembre de 2009, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes utilizados en los productos alimenticios (B.O.E. 08.10.2009) y el Real Decreto 1465/2009, de 18 de septiembre de 2009, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los colorantes utilizados en los productos alimenticios (B.O.E. 08.10.2009).***

Próximo al terreno de los aditivos y con un enfoque armonizador similar, encontramos la versión codificada de la ***Directiva 2009/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de abril de 2009 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes.***

7.5.3. Aromas

También en el entorno de los Aditivos Alimentarios, la base de su armonización partió de la **Directiva 88/388/CEE** del Consejo de 22 de junio de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros en el ámbito de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción, incorporada al Ordenamiento interno mediante el Real Decreto 1477/1990, de 2 de Noviembre de 1990, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción (B.O.E. 22.11.1990), modificado por **Real Decreto 1320/1992**, de 30 de octubre, (B.O.E. 20.11.92) y por **Real Decreto 4/2004** de 9 de enero (B.O.E 16.01.04).

La armonización ha avanzado hacia un procedimiento que evitase las diferencias entre las listas de aromas autorizados en los distintos Estados miembros, aprobado mediante el Reglamento (CE) nº 1331/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, por el que se establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios (aplicable en función del Reglamento 1334/2008), complementado con el Reglamento (CE) nº 1334/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre los aromas y determinados ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes utilizados en los alimentos y por el

que se modifican el Reglamento (CEE) nº 1601/91 del Consejo, los Reglamentos (CE) nº 2232/96 y (CE) nº 110/2008 y la Directiva 2000/13/CE (aplicable a partir del 20 de enero de 2011 salvo excepciones)

7.5.4. Materiales en contacto con alimentos

A partir de la **Dtva. 89/109/CE como punto de partida**, la armonización ha progresado, a base de enmiendas sucesivas y sobre la base de evidencias científicas de solidez creciente, hacia el establecimiento de relaciones de sustancias (monómeros, polímeros y sus aditivos) aptas para entrar en contacto con los alimentos, estableciendo sus condiciones de uso, límites de migración, métodos de cálculo (simulantes) y análisis y códigos obligatorios de buenas prácticas de fabricación. Progresivamente, como en otros campos, se va abandonando la forma Directiva para hacer prevalecer los Reglamentos, de inmediata y directa aplicación, que no precisan transposición y evitan desfases entre los calendarios normativos de los distintos Estados miembros.

Han supuesto hitos en este proceso el ***Reglamento (CE) 1935/2004, de 27 de Octubre de 2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE; el Reglamento (CE) 2023/2006, de 22 de Diciembre de 2006, de la Comisión, sobre buenas prácticas de fabricación de materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos*** y, más recientemente, respondiendo a las necesidades planteadas por la innovación en la materia, el ***Reglamento (CE) Nº 450/2009 de la Comisión, de 29 de mayo de 2009, sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos.***

También es novedad a destacar el ***Reglamento (CE) 975/2009 de la Comisión, de 19 de octubre de 2009, por la que se modifica la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios***, que supone la sexta enmienda de la normativa europea de plásticos.

La aprobación de este Reglamento surge de la necesidad de actualizar las listas positiva de monómeros y otras sustancias de partida y de aditivos recogidas en la Directiva 2002/72/CE, una vez que EFSA ha emitido una opinión favorable de los mismos.

7.5.5. Contaminantes agrícolas e industriales

El procedimiento, similar al de otras categorías pero innovador porque no se contaba con un instrumento marco preexistente, ha consistido en la aprobación del **Reglamento 315/93, de 8 de Febrero de 1993, del Consejo por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios**, como "Reglamento Marco", en el que se han establecido, transversalmente, condiciones aplicables a todos los contaminantes en cualquier matriz. A partir de dicho Reglamento se ha avanzado en especificidad por contaminantes (enfoque más transversal que los pretéritos, por productos):

- Desarrollo MICOTOXINAS (Aflatoxinas, OTA, DON…).
- Desarrollo NITRATOS.
- Desarrollo METALES PESADOS.
- Desarrollo OTROS CONTAMINANTES (Dioxinas, 3MCPD, HAPs, Acrilamida…).

Y, para cada categoría de contaminantes, se han establecido reglamentariamente condiciones de TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS.

Uno de los instrumentos más recientes dentro de la transversalidad —y sin perjuicio de los desarrollos para contaminantes específicos— es el ***Reglamento 1881/2006, de 19 de Diciembre de 2006, de la Comisión, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.***

7.6. Información al consumidor en alimentos de consumo ordinario, alimentos enriquecidos, complementos dietéticos, alimentos destinados a regímenes especiales, "novel food" y biotecnología: Etiquetado, presentación y publicidad; etiquetado sobre propiedades nutricionales; alegaciones nutricionales y de salud

El legislador comunitario ha reconocido la importancia de no volver la espalda al consumidor en materia de información que condiciona su seguridad alimentaria o, simplemente, su opción de compra. A partir del año 2000 la UE está inmersa en un proceso de **REVISIÓN de las REGLAS ETIQUETADO** para evaluar si la legislación vigente responde a las expectativas y necesidades de los consumidores y necesita ser simplificada.

La revisión y actualización (aún en curso y orientada hacia un nuevo Reglamento global que se encuentra en fase de propuesta), aborda en paralelo aspectos de información en el etiquetado y aspectos relativos a la gestión del riesgo nutricional. Partió de instrumentos generales preexistentes como la Dtva Etiquetado (2000/13), la Dtva "Marco" de Dietéticos (89/398/CE, hoy ya modificada por la Directiva 2009/39/CE…), la Directiva de Suplementos Nutricionales (2002/46/CE), con una mecánica similar para todas ellas: Modificando las Directivas previas o adoptando Directivas nuevas, bien en sustitución de las precedentes, bien como legislación "ex novo" en aquellos ámbitos que no habían sido armonizados.

7.6.1. Información en el etiquetado y la publicidad

La Directiva 79/112/CEE del Consejo, de 18 de diciembre de 1978, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, ha sido modificada en diversas ocasiones y de forma sustancial. El Legislador comunitario reconocía, en los "considerandos" de la Directiva 2000/13/CE (la que vino a reemplazar a la 79/112/CE) que "conviene, en aras de una mayor claridad y racionalidad, proceder a la codificación de dicha Directiva".

Sin embargo, el mejor avance cualitativo parte del reconocimiento de que se necesita un Acto que proteja al consumidor, y no sólo que asegure la ausencia de dificultades en el comercio intracomunitario, derivadas de las divergencias entre las legislaciones en materia de etiquetado de los Estados miembros (ese era el espíritu prevalente en la 79/112/CE…).

El texto codificado resultante de numerosas modificaciones de la Directiva 79/112/CE es el aprobado en la ***Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de marzo de 2000, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios***, modificada también en numerosas ocasiones y, en última instancia por la ***Directiva 2008/5/CE de la Comisión, de 30 de enero de 2008, relativa a la indicación en el etiquetado de determinados productos alimenticios de otras menciones obligatorias distintas de las previstas en la Directiva 2000/13/CE.***

En el ordenamiento español, la Norma General de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios fue aprobada (incorporando las Directivas comunitarias correspondientes) mediante el **Real Decreto 1334/1999,**

de 31 de julio, que también viene siendo objeto de modificaciones y actualizaciones periódicas en función de las Disposiciones comunitarias. Así, fue modificado en el año 2004 para incluir la obligación de realizar una mención clara a la presencia de sustancias causantes de alergias e intolerancias alimentarias. La última modificación la constituye el **Real Decreto 1245/2008, de 18 de julio,** donde se recoge el anexo actualizado de las sustancias que obligatoriamente deben declararse así como las excepciones previstas.

Otro ejemplo de etiquetado de caución sería el ***Real Decreto 906/2003, de 11 de Julio de 2003, relativo al etiquetado de los productos alimenticios que contienen quinina o cafeína*** (B.O.E. 12.07.2003), transposición de la ***Directiva 2002/67/CE*** de la Comisión, de 18 de julio de 2002, relativa al etiquetado de productos alimenticios que contienen quinina y productos alimenticios que contienen cafeína.

Se han establecido reglas de etiquetado particulares, más estrictas, de carácter adicional a las recogidas en la norma "marco" de etiquetado, en varios casos, como en lo ***Complementos Alimenticios (RD 1487/2009, de 26 de septiembre, transposición de la Dtva 2002/46/CE***), los alimentos destinados a regímenes especiales ("dietéticos"), la trazabilidad de carne de vacuno (en el marco de las medidas de prevención de las Encefalopatías Transmisibles) y en los llamados "nuevos alimentos e ingredientes", particularmente los obtenidos por biotecnología. Además, se ha actualizado el etiquetado sobre propiedades nutritivas (etiquetado nutricional), aún voluntario a expensas de la nueva propuesta en discusión (Propuesta de Reglamento sobre Información al Consumidor).

El Etiquetado de propiedades nutritivas partió de ***la Directiva 90/496/CEE del Consejo, de 24 de septiembre de 1990, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios***, incorporada al Ordenamiento español mediante el ***Real Decreto 930/1992, de 17 de julio***.

La Directiva 90/496/CE, absolutamente insuficiente, ha sido sustituida por la ***Directiva 2008/100/CE de la Comisión, de 28 de octubre de 2008, por la que se modifica la Directiva 90/496/CEE del Consejo, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, en lo que respecta a las cantidades diarias recomendadas, los factores de conversión de la energía y las definiciones***. A su vez, esta Directiva 2008/100 se ha incorporado a nuestro Ordenamiento mediante el ***Real Decreto 1669/2009 de 6 de noviembre, que modifica al Real Decreto 930/1992 por el que se aprueba la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios*** (Boletín Oficial del Estado, 7 de noviembre de 2009).

La indicación de la Trazabilidad en el Etiquetado carne vacuno (permite al consumidor conocer el origen de los animales, su ubicación en cada una de las fases de cría y cebo y la ubicación de los procesos de sacrificio y faenado), se reguló por el ***Real Decreto 1698/2003, de 12 de Diciembre de 2003, por el que se establecen disposiciones de aplicación de los Reglamentos comunitarios sobre el sistema de etiquetado de la carne de vacuno*** (B.O.E. 20.12.2003), modificado en última instancia por el ***Real Decreto 75/2009, de 30 de enero, por el que se modifica el Real Decreto 1698/2003, de 12 de diciembre***, por el que se establecen las disposiciones de aplicación de los Reglamentos comunitarios sobre el sistema de etiquetado de la carne de vacuno, […] (B.O.E. 31.01.2009).

Los alimentos destinados a regímenes especiales, "dietéticos", son aquellos que satisfacen necesidades nutricionales determinadas de colectivos concretos. Su armonización partió de una "directiva marco" la 89/398/CE, hoy reemplazada por la Directiva 2009/39/CE. En el Anexo de la primera se comprometía al desarrollo armonizador de categorías específicas de alimentos destinados a regímenes especiales. Algunos desarrollos sectoriales se han llevado a término, como más adelante se expondrá. Otras categorías, sigue (y seguirán, posiblemente), sin normativa propia (alimentos pobres en sodio, los alimentos para diabéticos, los alimentos para prematuros, las dietas de muy bajo valor energético para control de peso…). Aunque la Directiva marco de dietéticos prevé que se regulen de forma específica los alimentos destinados a un intenso desgaste muscular sobre todo destinados a deportistas, la Comisión Europea no ha presentado hasta la fecha ninguna propuesta legislativa específica en este ámbito.

Los productos alimenticios destinados a una alimentación especial para los que la legislación europea y nacional ha establecido disposiciones específicas son, hasta la fecha, los siguientes:

- Preparados para lactantes y de continuación (***Real Decreto 867/2008)***: destinados a lactantes sanos desde su nacimiento hasta la introducción de la alimentación complementaria.
- Alimentos Elaborados a Base de Cereales y Alimentos Infantiles para Lactantes y Niños de Corta Edad ***(Real Decreto 490/1998):*** destinados a los lactantes durante el período de destete y a los niños de corta edad, como complemento de su dieta o para su progresiva adaptación a los alimentos normales.
- Productos alimenticios destinados a ser utilizados en dietas de bajo valor energéticos para reducción de peso ***(Real Decreto 1430/1997***).

- Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales (***Real Decreto 1091/2000***).
- Productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten (***Versión consolidada, tras la corrección de errores, del Reglamento (CE) 41/2009***, sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten DOUE L 16, de 21.1. 2009).

También se ha regulado (desde la doble óptica nutricional y de información del etiquetado**) las sustancias nutritivas que pueden añadirse a los alimentos "dietéticos" con excepción de los preparados para lactantes y de continuación y los alimentos infantiles a base de cereales que se regulan por sus normas específicas, mediante el** *Reglamento (CE) 953/2009 de la Comisión, de 13 de octubre de 2009 sobre sustancias que pueden añadirse para fines de nutrición específicos en alimentos destinados a una alimentación especial*. **El Reglamento, que entra en vigor a los 20 días de su publicación derogará, con efectos desde 31 de diciembre de 2009, el Real Decreto 956/2002, de 13 de septiembre, por el que se aprueban las sustancias que pueden añadirse para fines de nutrición específicos en los preparados alimenticios destinados a una alimentación especial.**

Los "Nuevos Alimentos e Ingredientes" y los alimentos e ingredientes obtenidos por medios biotecnológicos plantean necesidades especiales de etiquetado, por su propia naturaleza y por las posiciones extremas que en ocasiones ha adoptado el consumidor frente a estas categorías.

Inicialmente, el ***Reglamento (CE) 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 1997, sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios*** (DO L 43 de 14.2.1997) era la única norma de referencia para todas la categorías de Nuevos Alimentos, en el sentido en que dicho Reglamento los define. Sus exigencias en materia de etiquetado resultaban insuficientes para los obtenidos por biotecnología que, finalmente, fueron objeto de una regulación propia. El fundamento de este Reglamento es triple: Evitar cualquier riesgo vinculado a la ingesta, no inducir a error al consumidor y que el "nuevo alimento/ingrediente/ no implique desventajas nutricionales frente a su homólogo convencional.

Sobre una evaluación de seguridad y eficacia, se basa en la aprobación caso por caso, mediante Actos vinculantes con rango de Decisión en los que establece las condiciones de uso, las exigencias adicionales de etiquetado y la alegación bajo la que se puede comercializar el alimento o ingrediente. Como ejem-

plos recientes de tales Decisiones, cabe mencionar la ***Decisión (2009/778/CE) de la Comisión, de 22 de octubre de 2009, relativa a la extensión de los usos del aceite de alga de la microalga Schizochytrium sp. como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) no 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo, o la Decisión (2009/777/CE) de la Comisión, de 21 de octubre de 2009, relativa a la extensión de los usos del aceite de alga de la microalga Ulkenia sp. como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) no 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo.***

En ocasiones, las prescripciones relativas al etiquetado contenidas en las distintas Decisiones no han resultado suficientes, por ofrecer lagunas o contradicciones, y ha sido preciso avanzar con Actos complementarios, siendo un ejemplo característico el ***Reglamento (CE) 608/2004, de la Comisión, de 31 de marzo de 2004, relativo al etiquetado de alimentos e ingredientes alimentarios con fitosteroles, ésteres de fitosterol, fitostanoles o ésteres de fitostanol añadidos***.

Un caso particular, también aunando necesidades de evaluación y de información, es el de los alimentos e ingredientes obtenidos por medios biotecnológicos, es decir: Los que consisten, contienen o proceden de **Organismos Modificados Genéticamente**.

Inicialmente gestionados, en el marco alimentario, desde el Reglamento de Nuevos Alimentos, 258/1997, en conjunción con dos Directivas de evaluación medioambiental 90/219, sobre utilización confinada de OGM y 90/220, sobre liberación intencional al medio ambiente de OGM), pronto se puso de manifiesto la insuficiencia de ese marco para responder a las necesidades, tanto de evaluación en el marco de una ingesta no aguda, como en el de la información demandada por la sociedad ante la irrupción de los OGM en el mundo alimentario.

Tal insuficiencia, unida a razones de naturaleza distinta de la científico-técnica, desembocó en una moratoria de facto que impidió, durante años, la autorización administrativa de OGM por más que su evaluación del riesgo hubiera resultado favorable.

Aunque la percepción negativa por parte de la sociedad no se ha resuelto, la moratoria sucubió a un nuevo paquete normativo, amplio y estricto tanto en sus exigencias de evaluación como en las de etiquetado. Las Directivas mencionadas, 90/219 y 90/220 fueron sustituidas, respectivamente, por las Directivas 98/81 y 2001/18, incorporadas al Ordenamiento interno mediante una Ley de predominio medioambiental. La UE aprobó, además, para la evaluación sanitaria y medioambiental de los OGM el Reglamento 1989/203, y para regular su

trazabilidad integral y etiquetado, el 1830/2003, tanto si los OGM formaban parte de alimentos para consumo humano como si lo hacían de los piensos.

Este paquete de Disposiciones, que entró en vigor en abril de 2004, se vió posteriormente completado con el Reglamento 65/2004, sobre Identificadores Únicos de OGM y mediante un Reglamento de desarrollo del 1829/2003: El Reglamento 641/2004. Más recientemente se ha aprobado la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente, que viene a modificar la mencionada Directiva 98/81/CE.

Alegaciones Nutricionales y de Salud. Las bases legales dependientes de la Directiva marco de Etiquetado y sucesivas modificaciones no dejaban lugar a dudas en cuanto a la prohibición de formular alegaciones de función, específicamente las preventivas y terapéuticas. Sólo los ingredientes o alimentos que hubiesen superado el procedimiento de evaluación del Reglamento 258/1997 (Nuevos Alimentos e Ingredientes) podían, en condiciones bien determinadas y aprobadas mediante Actos con rango de Decisión, formular alegaciones concretas. El ejemplo característico es la capacidad de contribuir a reducir el nivel de colesterol. Pero los supuestos restantes (Alimentos de consumo ordinario, alimentos enriquecidos, complementos de la dieta), no podían, en modo alguno formular alegaciones más allá de las que informaban acerca de su contenido enriquecido o empobrecido en determinados nutrientes. Esto propició dos categorías de alegaciones: Unas "de jure", al amparo del Reglamento 258/1997, y otras "de facto", cuya reconducción por la autoridad competente dependía, en cierta medida, de la audacia y rotundidad de los mensajes. Evidentemente, esto propiciaba un marco de competencia desleal en el que competían los productos con derecho a formulara alegaciones preventivas con aquellos otros que no podían hacerlo legalmente.

Con el fin de resolver esta situación de competencia desleal y asegurar el derecho del consumidor a una información veraz y completa, se aprobó el ***Real Decreto 1907/19992, de 2 de agosto, sobre publicidad y promoción comercial de productos, actividades o servicios con pretendida finalidad sanitaria***. Esta Disposición cumplió su función parcialmente, y tampoco sirvió para arbitrar el necesario equilibrio entre el derecho a la información de los ciudadanos y la aspiración legítima de la industria alimentaria de alegar aquellas propiedades funcionales que respondían a una evaluación acreditada de seguridad y eficacia.

Por ello, merece consideración especial el ***Reglamento 1924/2006, sobre Alegaciones Nutricionales y de Salud*****,** como solución armonizadora que vino a resolver (al menos, parcialmente) esta cuestión en el marco del Espacio Eco-

nómico Europeo. Por una parte, ha abierto definitivamente la posibilidad de formular alegaciones preventivas en el marco alimentario, sobre la base de la demostración científica. Por otra, supone un procedimiento indirecto para regular un ámbito tan indefinido como el de los ***"alimentos funcionales"***, concepto que carece de definición en toda la legislación comunitaria y nacional. Con ello redundará a favor tanto de la protección de los derechos de los consumidores, incluidos los sanitarios, como de los de los agentes económicos, que venían padeciendo en esta materia situaciones de competencia desleal.

Preocupa que los mecanismos previstos para impedir la incitación al consumo de productos cuyo perfil nutricional pueda ser cuestionable en todo o en parte, quede legalmente supeditada a un concepto de ***"perfil nutricional"***, contemplado en el mencionado Reglamento 1924/206 y ss, que suscita controversia entre los agentes de la cadena alimentaria, los agentes de control y la propia comunidad científica.

El Reglamento 1924/2006 establece circuitos procedimentales de complejidad creciente para aprobar las alegaciones, siendo los más sencillos lo relativos a alegaciones de contenidos (que se plasman en una suerte de lista positiva anexa al Reglamento), y los más complejos los que se refieren a las alegaciones de disminución de riesgo de contraer una enfermedad o los que afectan a la salud y desarrollo de los niños. Estas dos última categorías quedan supeditadas a la evaluación por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que notifica periódicamente a la Comisión Europea los resultados de sus evaluaciones, para que la mencionada Institución comunitaria los plasme en Actos vinculantes. En este sentido, como ejemplos recientes, cabe citar los ***Reglamentos (CE) 983/2009 y 1024/2009, de la Comisión, sobre la autorización o denegación de autorización de determinadas declaraciones de propiedades saludables en los alimentos relativas a la reducción de riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños***. O los que recogen exclusivamente denegaciones para declaraciones generales, como los ***Reglamentos 984/2009 y 1025/2009, por los que se deniega la autorización de determinadas declaraciones de propiedades saludables en los alimentos, distintas de las que de refieren a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.***

7.6.2. Propuesta de Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la información alimentaria facilitada al consumidor

A la vista de lo expuesto no es difícil concluir que la legislación que, de una u otra forma está relacionada con la información al consumidor resulta,

cuando, menos, de manejo laborioso, y con asimetrías que no se resolverían con una simple codificación. Por ello, las Instituciones comunitarias, que siguen sin encontrar plena respuesta a sus interrogantes de partida (evaluar si la legislación vigente responde a las expectativas y necesidades de los consumidores y necesita ser simplificada, ha puesto en marcha una propuesta de gran amplitud: Un futuro Reglamento sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. En el momento de redactar estas líneas, la Propuesta (6172/08 DENLEG 10 SAN 25 CONSOM 18 CODEC 162, 12338/09 DENLEG 67 CODEC 999, Bruselas, 16 de septiembre de 2009) aún tiene por delante un largo período de debate. Aportará una visión aún más cercana a la protección del consumidor e incorporará al ámbito reglamentario aspectos hasta ahora facultativos, como el Etiquetado Nutricional. En la formulación de su propuesta la Comisión Europea ha perseguido conocer las necesidades y puntos de vista de todas las partes afectadas, en el marco de una iniciativa conocida como ***"Labelleing-Better Regulation"*** ("Legislando mejor en etiquetado", que forma parte de una iniciativa más amplia, "Better Regulation", que fundamentalmente pone el acento en la eliminación de cargas administrativas prescindibles o inútiles, particularmente negativas para las Pymes).

8. BASES LEGALES DE LA GESTIÓN INSTRUMENTAL DEL RIESGO ALIMENTARIO

8.1. El Principio de Precaución

También es importante en este momento detenernos en la relación o interconexión entre evaluación y gestión. No hay discusión en cuanto a que las medidas de gestión deban tener necesaria —o preferiblemente— una base de evaluación lo más exenta posible de controversia. Pero si la evaluación es ciencia (*"Proceso basado en el conocimiento científico…"*), no siempre va a ser fácil encontrar una base de evaluación completa y con ausencia de controversia. De aquí surge, inmediatamente, la discusión acerca de la oportunidad y la proporcionalidad, en ocasiones al servicio de conceptos que se manejan con criterios distintos en el ámbito científico y en el legislativo o judicial: Severidad, gravedad, inmediatez en la aparición de los efectos nocivos…

Las tendencias actuales en la gestión de una seguridad alimentaria que ha de vérselas con peligros emergentes que a veces debutan sin antecedente alguno, con efectos nocivos basados en la exposición repetida y en la acumulación,

con agentes cuya acción patógena puede tardar años en manifestarse como reacción viva, se compadecen mal con una aproximación cartesiana y positivista a la interrelación entre la evaluación y la gestión.

La solución a estos conflictos viene dada, en el plano teórico, por el Principio de Precaución o Principio de Cautela, recogido por primera vez en un instrumento normativo alimentario en el artículo 7 del Reglamento 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen los Principios y Requisitos Generales de la Legislación Alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan Procedimientos relativos a la Seguridad Alimentaria:

"En circunstancias específicas, cuando tras haber evaluado la información disponible, se observe la posibilidad de que haya efectos nocivos para la salud, pero siga existiendo incertidumbre científica, podrán adoptarse medidas provisionales de gestión del riesgo para asegurar el nivel elevado de protección de la salud por el que ha optado la Comunidad, en espera de disponer de información científica adicional que permita una determinación del riesgo más exhaustiva.

Las medidas así adoptadas serán proporcionadas y no restringirán el comercio más de lo requerido para adoptar el nivel de protección de la salud por el que ha optado la Comunidad, teniendo en cuenta la viabilidad técnica y económica y otros factores considerados legítimos para el problema en cuestión. Estas medidas serán revisadas en un plazo de tiempo razonable, en función de la naturaleza del riesgo observado para la vida o la salud y del tipo de información científica necesaria para aclarar la incertidumbre y llevar a cabo una determinación del riesgo más exhaustiva".

Afirmamos que la regulación normativa del Principio de Precaución mediante un Acto comunitario con rango de Reglamento, y por tanto vinculante y de aplicación directa e inmediata, es hoy por hoy una solución esencialmente teórica. La verdadera solución práctica ha de venir de la construcción de una doctrina de aplicación y de la clarificación jurisprudencial de este Principio, que en la actualidad, pese a su naturaleza jurídica, sigue siendo mejor comprendido por los evaluadores y gestores de riesgo que por la sociedad y por los tribunales de justicia.

8.2. El Control Sanitario de Alimentos y Procesos: Sus Bases Legales

Nos hemos venido refiriendo extensamente a las reglas del juego de cuyo escrupuloso cumplimiento debiera seguirse, como lógica consecuencia, un nivel

de seguridad aceptable para la comunidad, siempre y cuando dichas reglas sean completas, actualizadas, basadas en la ciencia y equiparables a las de los países del entorno. Pero ya nos hemos manifestado en contra de una concepción parcial de la gestión del riesgo en la que además de las medidas normativas (*"Proceso… que consiste en ponderar las distintas opciones normativas…"*), tienen cabida ineludible las medidas instrumentales (*"…y, si fuera necesario, en seleccionar las posibles medidas de prevención y control apropiadas"*). La definición más simple de "Seguridad Alimentaria" (como resultado de legislar y controlar) cobra plena vigencia en esta concepción integral de la gestión de riesgos.

Es imprescindible constatar que las reglas se cumplen y que, cumpliéndose, arrojan el resultado esperado en términos de seguridad. Y es también imprescindible, en la práctica, contar con mecanismos eficaces de reconducción cuando tales reglas se transgreden o no surten efecto, sea por estar mal diseñadas, obsoletas, incompletas o carentes de base científica adecuada.

Cualquier gestor de riesgos alimentarios debe estar en condiciones de responder a dos cuestiones fundamentales: Cómo legislar y cómo controlar.

La constatación del adecuado cumplimiento de las normas, y la calidad de éstas en términos de eficacia, pasa por el ejercicio del control. Es la medida instrumental por excelencia de la gestión de riesgos alimentarios.

Cabe afirmar que el control ha acompañado desde siempre a cualquier concepción al uso de seguridad alimentaria o inocuidad. Procede, no obstante, poner de manifiesto algunas consideraciones y elementos diferenciales que impregnan hoy cualquier aproximación al concepto de control alimentario:

El control, como constatación del cumplimiento, compete a las autoridades competentes, a los agentes de control, bien matizado como control oficial. Sin embargo, el control no empieza en la supervisión oficial, sino que debe ser abordado ya por el operador económico, quien mediante la aplicación del autocontrol (en los supuestos y condiciones recogidos en el Reglamento 852/2004, *relativo a la Higiene de los Productos Alimenticios*), ha de estar en condiciones de impedir la salida al mercado de productos no seguros.

El control, igual que la propia cadena alimentaria, debe ser objeto de una consideración integral, sin fragmentaciones, en razón de materia o fase de la cadena, que comprometan el resultado final en términos de garantía de seguridad que con aquél se persigue. En este sentido, la aprobación del Reglamento 882/2004, *"sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales"*, es absolutamente con la orientación in-

tegradora del Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria, obligando a los Estados miembros a elaborar y aplicar un Plan de Control único, plurianual e integrado (SIMNCP) (*"single integrated multianual national control plan"*). La Comisión Europea, consciente de la dificultad de esta concepción innovadora, aprobó una Decisión —obligatoria— con directrices para ayudar a los Estados miembros en la la elaboración de este tipo de planes ***(Decisión de la Comisión, 2007/363/CE, de 21 de mayo de 2007, estableciendo directrices para asistir a los Estados miembros en la preparación del Plan Nacional Único, Plurianual e Integrado previsto en el Reglamento 882/204/CE; Decisión de la Comisión, 2006/677/CE, por la que se fijan criterios para la realización de auditorías con arreglo al reglamento 882/2004/CE)***.

El aseguramiento de la calidad también irrumpe en el ámbito del control oficial. Pero lo novedoso es que no se trata de aseguramiento de la calidad de los productos y procesos, sino del propio ejercicio del control oficial. Por ello, el mencionado Reglamento 882/2004 introduce la obligación de evaluar la calidad del control oficial mediante auditorías de los propios sistemas de control. Esta innovación, necesaria desde todo punto de vista, supone un verdadero desafío y entraña dificultades conceptuales, instrumentales e incluso competenciales que no cabe desconocer. Para abordar con éxito las dos primeras, la Comisión Europea (DG SANCO) aprobó otra Decisión (2006/677/CEE) "por la que se establecen las directrices que fijan criterios para la realización de auditorías con arreglo al Reglamento 882/2004…". En última instancia, los sistemas y actividades de control de los Estados miembros so auditados por la Oficina Alimentaria y Veterinaria de la Comisión Europea.

8.3. Bases Legales de los Sistemas de Alerta Rápida

Pero hemos hablado también de sistemas de reconducción. La seguridad alimentaria responde a una prioridad, que es la protección de la salud. Es preciso, por tanto, diseñar escenarios en los que los procedimientos habituales de gestión de riesgos no permitan alcanzar los niveles de protección deseados o, simplemente, fracasen, por razones y responsabilidades diversas.

Para hacer frente a tales situaciones contamos con los **Sistemas de Intercambio Rápido de Información o Redes de Alerta**, de ámbito nacional (en España, Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información, SCIRI, gestionado por la AESAN; en la UE el Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF, gestionado por la DG SANCO de la Comisión Europea; y a nivel mun-

dial la red INFOSAN-Emergencies, gestionada por la OMS. En el ámbito de la UE y sus Estados miembros, **la base legal de la gestión de las redes de alerta se encuentra recogida en el Reglamento 178/2002**, (artículo 50 y ss) ya referenciado.

Antes que entender un sistema de red de alerta como "el fracaso del control oficial" —aunque algo tenga de cierto— debemos asumirlo como un procedimiento excepcional complementario al control. Su finalidad es impedir que un alimento inseguro o sospechoso llegue al consumidor o, formulado sensu contrario, impedir el acceso del consumidor a productos inseguros o potencialmente inseguros. Desde un planteamiento más conceptual cabe afirmar que un sistema de red de alerta persigue evitar la extensión espacial y la prolongación temporal de cualquier incidente de seguridad alimentaria, sea crítico o no.

La Comunicación del Riesgo puede estar al servicio, en ocasiones, de la gestión de la red de Alerta, pero procede resaltar que la mayoría de los episodios notificados a través de la red de alerta pueden gestionarse sin recurso a la comunicación, que ha de reservarse para aquellos casos en los que los sistemas convencionales o excepcionales son incapaces de asegurar que el consumidor no podrá acceder a un producto sospechoso, por lo que se precisa alertar a la población para que adopte a título particular medidas uniformes, que en modo alguno han de confundirse con decisiones unilaterales de autoprotección, casi siempre infundadas y desproporcionadas en tanto que suelen responder a la percepción subjetiva de los riesgos, antes que a factores de peligro reales.

8.4. Planes Integrados de Control, Sistemas de Riesgos y Naturaleza de los Riesgos

Anteriormente se ha comentado que el control, igual que la propia cadena alimentaria, debe ser objeto de una consideración integral, sin fragmentaciones, en razón de materia o fase de la cadena, que comprometan el resultado final en términos de garantía de seguridad que con aquél se persigue. Esto supone el abordaje de cada factor de peligro desde el principio al final de la cadena, sin fragmentar su control en cada una de las fases de la misma, manteniendo estas inconexas. También supone tratar de evitar la vinculación de factores de peligro a alimentos concretos, siempre que ello sea posible.

Un Plan de control que responda a los principios y orientaciones del Reglamento 882/2004 debe estar integrado por sistemas de peligros o riesgos

biológicos, físicos, químicos y nutricionales, desde el principio de la cadena hasta el momento de compra, preparación y consumo del alimento.

Así, consideraciones fragmentarias como p. ej. "control de *Salmonella* en ponedoras" y "control de la prohibición de utilización de huevo fresco en la elaboración de salsas en restauración colectiva", se verían integradas, sin perder su identidad, en un sistema más coherente: Un Sistema transversal, del campo a la mesa, de control de riesgos biológicos. Este comprendería, también del campo a la mesa, un subsistema de zoonosis de transmisión alimentaria. Y este, a su vez, un programa transversal de control de salmonella, en todas las fases de la cedan y sin solución de continuidad. De esta forma se evita la existencia de "parcelas lacunares" —sin control— entre las distintas fases de la cadena, y se impide o minimiza que los peligros no controlados en una fase de dicha cadena se arrastren hasta la siguiente, en la que acaso ya no se ha previsto el tipo de control idóneo, que debería haberse llevado a cabo en la fase anterior.

A efectos prácticos, la agrupación de los peligros y riesgos en "biológicos", químicos", "físicos" y "nutricionales", en función de la naturaleza del factor de peligro, aun con las limitaciones que las ciencias de la vida imponen a cualquier enfoque cartesiano, se reconoce de plena validez para estructurar los sistemas de control.

8.5. El Control de la Frontera Externa

Tanto más importante cuanto más se impone la globalización en el comercio mundial de alimentos, la uniformidad en el control en la frontera externa de la UE puede llegar a condicionar el status sanitario real y percibido en el conjunto del Espacio Económico Europeo. La UE de los 27 es el mayor importador/exportador mundial, y sucesos como la importación de aceite de girasol crudo contaminado procedente de Ucrania, el fraude de la melamina en lácteos, y ottros no demasiado lejanos en el tiempo ponen de manifiesto la necesidad de llevar a su máximo rigor y eficacia los preceptos recogidos en el Reglamento 178/2002, ya analizado, y en las Disposiciones específicas.

En España, el Control en la frontera externa (que lo es, a su vez, de la UE, es competencia exclusiva del Estado) y el ejercicio del control está regulado en Disposiciones que se actualizan regularmente. También en este ámbito es la legislación comunitaria la que impone su legislación, tanto sustantiva como instrumental en muchos casos. A la vez, es la Comisión Europea la que negocia Acuerdos de Equivalencia con Países terceros, y la encargada de controlar que los establecimientos autorizados en dichos Países se ajustan, verdaderamente, a reglas equivalentes a las que se exigen en el Mercado Interior de la UE.

Se ha avanzado notablemente en cuanto a la homogeneidad de esa frontera externa, en cuando a su capacidad de admitir o rechazar, con criterios uniformes, productos alimenticios en importación que puedan resultar peligrosos o inseguros. También se ha avanzado al poder contar con una base legal que permite actuar, a nivel comunitario, más allá de los productos de origen animal, que durante años fueron los únicos regulados por la UE a efectos de control sanitario de comercio internacional. Y, más aún: En coherencia con el Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria, el control no se limita a los alimentos destinados a consumo humano, sino que se extiende a la alimentación animal (que, en definitiva, ha estado presente en la raíz de algunas crisis alimentarias). Un ejemplo reciente de todo ello es el ***Reglamento (CE) 669/2009 de la Comisión de 24 de julio de 2009, por el que se aplica el Reglamento (CE) 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 y se modifica la Decisión 2006/504/CE***.

En cuanto a la organización del control en frontera, a cargo de los Servicios de Sanidad Exterior, periódicamente se aprueban y actualizan Disposicones (generalmente con rango de Orden Ministerial) http://www.boe.es estableciendo modalidades de control sanitario a productos de comercio exterior destinados a uso y consumo humano y los recintos aduaneros habilitados para su realización, sin perjuicio de las acciones que se programan en virtud de las medidas de salvaguarda, nacionales o comunitarias, consecutivas por lo general a episodios de alerta alimentaria o a rechazos en frontera de cualquier Estado miembro.

9. ALGUNAS CONCLUSIONES

9.1. La situación actual

La situación actual o, mejor, la que se genera tras la consideración convencida de la necesidad de aplicar los Principios contenidos en el Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria, configura la paleta de colores que cualquier gestor de riesgos quisiera tener a su disposición para pintar su mejor cuadro. Destacaremos, para analizarlos con posterioridad, los elementos cardinales, a algunos de los cuales ya nos hemos referido:

- Concepción integral de todas las fases de la cadena alimentaria, al servicio de la máxima “del campo, a la mesa”.

- En consonancia con lo anterior, implicación de la producción primaria en las obligaciones de seguridad, en su consecución y mantenimiento.
- Reparto equitativo de responsabilidades en la génesis, mantenimiento y tutela de la seguridad: El responsable de poner un procuro seguro en el mercado es el agente económico, en tanto que corresponde a los agentes de control la tutela y reconducción de la seguridad alimentaria como resultado de un conjunto de actuaciones a cargo de un conjunto de actores.
- Como un ejemplo más de la seguridad jurídica al servicio de la seguridad alimentaria, concreción de las herramientas o procedimientos obligatorios en la consecución de la seguridad: La trazabilidad a lo largo de toda la cadena y el autocontrol basado en los Principios del Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) del Codex Alimentarius.
- Concepción extraterritorial y supratemporal de la seguridad alimentaria, adaptándola a la realidad de los grandes espacios sin fronteras que sirven de escenario al intercambio de mercancías alimentarias.
- Fundamentación de cualquier medida de gestión de riesgos, sea instrumental o normativa, en la mejor evidencia científica disponible.
- Posibilidad de recurso al Principio de Precaución, como medida de compatibilidad entre la protección adecuada, la proporcionalidad y la incertidumbre científica.
- Construcción de las políticas de seguridad alimentaria en la triada del Análisis de Riesgos Alimentarios, tal como lo establece la Comisión del Codex Alimentarius.
- Retorno a la forma "Reglamento" en detrimento de la forma "Directiva", para evitar disfunciones en la armonización derivadas de los desfases en el cumplimiento de los plazos de transposición por los Estados miembros.

9.2. ¿Renegociación del LBSA?

El espíritu que presidió la tramitación del "Paquete Higiene" y sus primeros desarrollos ha sido casi fugaz, pues una vez postergados a un segundo plano (¿por cuánto tiempo?) los temores a las crisis alimentarias, la balanza vuelve a inclinarse hacia la prevalencia de la libre circulación de mercancías, en detrimento de unas garantías sanitarias que, pese a todo, la sociedad sigue demandando.

Hay ejemplos en la gestión de plazos de los Reglamentos del Paquete Higiene (retrasando hasta 5 años las fechas inicialmente acordadas por el Consejo de Ministros de la UE), simplificación de la información, peso creciente de la óptica de la DG Empresa de la Comisión Europea, frente a la doctrina sanitaria de la DG SANCO, interpretación al alza de la necesaria flexibilidad, el Autocontrol basado en APPCC entendido (y presentado) como una pesada carga que urge simplificar… Muchos indicios que, en definitiva, ponen de manifiesto que la "nueva" legislación europea en seguridad alimentaria viene dando sus frutos: Se reclama menor exigencia porque las crisis se distancian, el consumidor es más maduro, los niveles de inocuidad son plausibles, y la capacidad de reacción, hasta ahora, suficiente. La legislación que se pretende simplificar más y más viene dando sus frutos. Será difícil ofrecer al ciudadano un riesgo tendente a cero con un marco legal laxo, insuficiente o trasnochado. Es el momento de estar atento a la evidencia científica y legislar con coherencia.

9.3. El Anteproyecto de Ley de Seguridad Alimentaria y Nutrición 2009

No cabe cerrar este capítulo sin mencionar, al menos, esta iniciativa de futuro. Cuando se edite esta monografía, el Anteproyecto de Ley de Seguridad Alimentaria y Nutrición, promovido por el Gobierno y gestionado desde la AESAN del Ministerio de Sanidad y Política Social, posiblemente no haya ingresado aún como Proyecto en el Congreso de los Diputados. No es momento ni lugar para analizar contenidos, por definición provisionales, del anteproyecto en curso. Cabe, en todo caso, la valoración positiva de una iniciativa de esta naturaleza, en la que todos los agentes de la cadena alimentaria depositamos las mejores expectativas.

Socios de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia a quien expresamos nuestra sincera gratitud por su mecenazgo:

Farmaindustria

Roche Farma

Laboratorios Janssen-Cilag
Alcaliber S.A.
Almirall, S.A.
Bristol-Myers Squibb, S.L.
Grupo Ferrer Internacional
Laboratorios Esteve
Laboratorios MSD
Laboratorios Rovi
Novartis Farmacéutica
Tedec-Meiji Farma S.A.
Sanofi-Aventis
Laboratorios Menarini

Aragofar

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos
Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid

Colegios Oficiales de Farmacéuticos de: A Coruña, Alicante, Badajoz, Barcelona, Bizkaia, Burgos, Cáceres, Cádiz, Ciudad Real, Girona, Palencia, Principado de Asturias, Santa Cruz de Tenerife, Tarragona, Toledo y Zaragoza.