

Diego Lozano Benito

Evaluación de la seguridad  
alimentaria de los menús servidos  
en centros de educación infantil  
del Ministerio de Defensa

Director/es

Lázaro Gistau, Regina  
Bayarri Fernández, Susana

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA  
DE LOS MENÚS SERVIDOS EN CENTROS DE  
EDUCACIÓN INFANTIL DEL MINISTERIO DE  
DEFENSA

Autor

Diego Lozano Benito

Director/es

Lázaro Gistau, Regina  
Bayarri Fernández, Susana

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
Escuela de Doctorado

2021



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
Departamento de Producción Animal  
y Ciencia de los Alimentos



EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD  
ALIMENTARIA DE LOS MENÚS SERVIDOS  
EN LOS CENTROS DE EDUCACIÓN INFANTIL  
DEL MINISTERIO DE DEFENSA

TESIS DOCTORAL

DIEGO LOZANO BENITO

Zaragoza, 2020



**Facultad de Veterinaria**  
**Universidad Zaragoza**



Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

## TESIS DOCTORAL

### **Evaluación de la seguridad alimentaria de los menús servidos en los centros de educación infantil del Ministerio de Defensa**

Memoria presentada por:

D. Diego Lozano Benito

Para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Directoras:

Dra. Regina Lázaro Gistau  
Dra. Susana Bayarri Fernández

Zaragoza, diciembre de 2020



*Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar*

Antonio Machado





*A mi familia  
y amigos*



## AGRADECIMIENTOS

*“Caminante, son tus huellas el camino, y nada más; caminante, no hay camino, se hace camino al andar...”*

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de Tesis, la Dra. Regina Lázaro Gistau y la Dra. Susana Bayarri Fernández, por aceptar el reto de esta Tesis y dejarme emprender el camino “a distancia”. Gracias por la confianza depositada y vuestros acogedores recibimientos en cada visita a mi antigua y querida Facultad. Muchas gracias por compartir vuestros conocimientos, experiencia y por el tiempo dedicado en la realización de esta Tesis Doctoral.

A la Dra. Consuelo Pérez Aquillué, por poder contar también con tus comentarios, ideas y, sobretodo, apoyo durante este largo viaje.

Al Excmo. Sr. General de Brigada Veterinario D. Alberto Pérez Romero, Director del Centro Militar Veterinaria de la Defensa durante mi formación en la especialidad de Bromatología e Higiene de los Alimentos, por su apoyo durante dicha formación y en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Al Ilmo. Sr. Coronel D. Luis Ángel López Tomás, Director del Centro Militar de Veterinaria de la Defensa, que como mi primer jefe en el entonces Servicio de Bomatología e Higiene de los Alimentos me animó y apoyó en el inicio del camino.

A mi “Jefe”, el Teniente Coronel Veterinario D. Alberto Zamora Benito. Gracias por la tutela durante mi período de formación como especialista, introducirme en el mundo docente universitario y acompañarme en los avances de esta Tesis Doctoral. Ahora, a tus órdenes en el Servicio, me toca no desandar lo aprendido y estar a la altura.

Al resto de personal del Servicio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública del Centro Militar de Veterinaria de la Defensa: Javi, los Albertos, “Profesor Velo”, Guzman, Dani, Pilar, Bea, Mariana y Marta, por vuestra inestimable ayuda, ánimos y momentos distendidos que han hecho más llevadera la travesía.

A la Comisión Docente de las especialidades complementarias de la especialidad fundamental de Veterinaria del Cuerpo Militar de Sanidad, por la constante preocupación en la mejora de la formación de los alumnos especialistas.

A los compañeros inspectores veterinarios destinados en Unidades del Ejército de Tierra, Armada, Ejército del Aire y Órgano Central por su profesionalismo y colaboración a través del cumplimiento de las campañas de control oficial.

Al Dr. Carlos Gutiérrez Ortega, por tu ofrecimiento desinteresado para ayudarme con el análisis estadístico de los datos.

Al personal de la empresa Kidsco, adjudicataria del servicio de alimentación de los centros de educación infantil del Ministerio de Defensa, así

como al personal de Colectividades Chabe y Quimicral, por su disposición y colaboración.

A la Dirección y profesorado del Máster de Salud Pública de la Escuela Nacional de Sanidad (ISCIII) y a la promoción del Máster de Salud Pública 2018-2019, por todas las horas compartidas en aquel intenso año y hacerme revivir el ambiente universitario.

Al Grupo de Trabajo de Laboratorios de Control Oficial de Alérgenos liderados por Maribel Prieto del Centro Nacional de Alimentación, por compartir vuestras experiencias y las dificultades analíticas a las que nos enfrentamos los laboratorios en los ensayos de alérgenos en alimentos.

A los comandantes Aitor Rípodas y Miguel Ángel Peláez, la Agrusan nos unió y el Centro nos reunió. Muchas gracias por vuestro compañerismo, amistad y kilómetros pedaleados acompañados de sudores, caídas, calambres, consejos y ánimos. Aitor, me dejaste marcado el camino a seguir y ahora le doy el relevo a Miguel Ángel (buen pan y buena gente) en sus primeros pasos del apasionante camino del doctorado.

A los también “octopuntas” Raquel, Manu y Aurora, por el interés en mis avances del doctorado y consejos y apoyos mutuos que nos proporcionamos.

Que sería de mi camino sin mis compañeros de promoción de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza: Manu, Nacho, Monchito, Dani, Manu “Alimoche” y el tridente formado por “El P. Vaji”, Javi “Pinse” y Neme. Ya habéis estado a mi lado la mitad del camino y, a parte de las Moncayo’s experiencias y muchas más vivencias inolvidables compartidas a vuestro lado, espero que podamos disfrutar de muchas más. Muchas gracias por esas quedadas que tanta vida me dan, vuestro aliento y lo orgullosos que estáis de vuestro colega veterinario militar. Igualmente lo estoy yo de vuestras carreras profesionales y de las familias que habéis formado.

No me puedo olvidar de otro veterinario consorte, Carlos Romero, y espero y deseo que el siguiente doctor, que junto a Nacho y Manu me habéis hecho desconectar tantas veces y apartar los libros y papeles para disfrutar de nuestras montañas y costas.

A Guiller y Jesús, mis amigos de toda la vida, que siempre sois mi vía de escape cuando regreso a mi querida Soria y así olvidarme por un rato de tanto portátil. Gracias por vuestra amistad y compañía durante tantos años.

A muchos amigos más, que sabéis quienes sois, que con vuestros ánimos constantes, una simple cañita, llamada, wassup...me cargáis de energía para no desfallecer en el camino.

A Noel y Liam, que desde la adolescencia me habéis amenizado todos los viajes de mi vida, y a muchos otros que con vuestras melodías también me habéis acompañado durante las largas horas sentado en Francisco Morano, García Solier y Darío Gazapo.

A mi abuela y a mis tíos, que siempre me veis sentado delante del dichoso portátil robándome tiempo de vuestras agradables visitas y me hacéis la misma pregunta. Ya llego al final del trayecto.

A mis hermanas, por vuestra comprensión, confianza y motivación en todos los caminos que emprendo.

Y como no, a los que han estado desde mis primeros pasos, mis queridos padres. A quienes debo todo lo que soy, ejemplo diario de esfuerzo, superación y humildad. Muchas gracias por vuestro constante estímulo y apoyo, así como por el cariño y amor que siempre me habéis dado. Me cuesta contener las lágrimas mientras escribo estas líneas: papá me sigues dando lecciones de vida aunque no te des cuentas y mamá eres el ejemplo de lucha y AMOR.

A todos, muchas gracias por tan grata compañía y por haber contribuido de una manera u otra a que este camino haya llegado a su fin y me queda el compromiso de seguir caminando por nuevos senderos y dejar huella.

*“...Al andar se hace camino, y al volver la vista atrás se ve la senda que nunca se ha de volver a pisar. Caminante, no hay camino, sino estelas en la mar”*



## ÍNDICE

---



# ÍNDICE

	<u>Paginas</u>
ÍNDICE DE TABLAS .....	XXIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XXIX
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS .....	XXXIII
RESUMEN .....	3
SUMMARY .....	7
CAPÍTULO I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	11
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	21
2.1 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS ALIMENTOS .....	21
2.1.1 Microorganismos patógenos .....	21
2.1.1.1 <i>Salmonella</i> spp. ....	21
2.1.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	25
2.1.1.3 <i>Cronobacter</i> spp. ....	28
2.1.2. Microorganismos indicadores de higiene del proceso .....	29
2.1.2.1 Aerobios mesófilos totales .....	30
2.1.2.2 Enterobacterias .....	30
2.1.2.3 Coliformes totales .....	30
2.1.2.4 <i>Escherichia coli</i> .....	31
2.1.2.5 Estafilococos coagulasa positivos .....	32
2.1.3 Métodos de detección y cuantificación de microorganismos .....	34
2.1.3.1 Métodos de referencia .....	34
2.1.3.2 Métodos alternativos .....	36
2.1.3.2.1 Métodos alternativos para el recuento de microorganismos .....	37
2.1.3.2.1.1 Automatización .....	37
2.1.3.2.1.2 Medios de aislamiento cromogénicos y fluorogénicos .....	37
2.1.3.2.1.3 Medios de cultivo modificados .....	37
2.1.3.2.1.4 Recuento basado en métodos bioquímicos ...	39
2.1.3.2.1.5 Recuento basado en métodos microscópicos	39
2.1.3.2.1.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) en tiempo real .....	40
2.1.3.2.2 Métodos alternativos para la detección de microorganismos patógenos .....	41
2.1.3.2.2.1 Medios de cultivo modificados .....	41
2.1.3.2.2.2 Inmunoensayos .....	41
2.1.3.2.2.3 Métodos basados en bacteriófagos .....	42
2.1.3.2.2.4 Métodos basados en microscopía .....	43
2.1.3.2.2.5 Métodos basados en biología molecular .....	43

	<u>Paginas</u>
2.1.4 Validación de los métodos alternativos .....	44
2.2 ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA DIETA DESTINADA A LA POBLACIÓN INFANTIL.....	45
2.2.1 Importancia de la alimentación saludable .....	45
2.2.2 Relación entre los hábitos alimentarios adquiridos en la infancia y la prevención de la enfermedad en el adulto.....	47
2.2.3 Características fisiológicas: crecimiento y desarrollo .....	48
2.2.4. Patrones alimentarios durante el período de 1 a 3 años ....	48
2.2.4.1 Formación del gusto alimentario y desarrollo de los hábitos alimentarios.....	48
2.2.5 Necesidades nutricionales .....	50
2.2.5.1 Tablas y bases de datos de composición de alimentos	51
2.2.5.2 Guías alimentarias o dietéticas.....	52
2.2.5.3 Objetivos nutricionales.....	54
2.2.5.4 Agua.....	55
2.2.5.5 Energía .....	55
2.2.5.6 Macronutrientes .....	56
2.2.5.6.1 Proteínas .....	56
2.2.5.6.2 Lípidos .....	57
2.2.5.6.3 Hidratos de carbono .....	58
2.2.5.7 Fibra dietética .....	59
2.2.5.8. Micronutrientes .....	60
2.2.5.8.1 Vitaminas .....	60
2.2.5.8.2 Minerales .....	63
2.2.6 Requisitos de la dieta infantil .....	65
2.2.6.1 Características de los principales grupos de alimentos	65
2.2.6.1.1 Cereales .....	65
2.2.6.1.2 Legumbres.....	65
2.2.6.1.3 Verduras y otras hortalizas .....	66
2.2.6.1.4 Frutas .....	66
2.2.6.1.5 Carnes y derivados cárnicos .....	67
2.2.6.1.6 Pescados y mariscos.....	67
2.2.6.1.7 Huevos .....	67
2.2.6.1.8 Leche y derivados lácteos .....	68
2.2.6.1.9 Frutos secos y semillas .....	68
2.2.6.1.10 Aceites .....	68
2.2.6.1.11 Bollería, pastelería y productos azucarados.....	69
2.2.6.1.12 Sal y alimentos salados .....	69
2.2.6.2 Distribución de las comidas .....	70
2.2.6.3. Cantidades y raciones de alimentos: Pirámide de la alimentación saludable .....	72
2.2.6.4 Alimentación de niños de corta edad .....	73
2.2.6.4.1 Alimentación complementaria del niño de 6 a 12 meses.....	73
2.2.6.4.2 Menú diario más adecuado para niños de 1 a 3 años	77

	<u>Paginas</u>
2.2.6.5. El comedor escolar .....	79
2.2.6.6. Cómo debe ser un buen menú escolar.....	80
2.2.6.7. Políticas de salud pública infantil.....	82
2.2.6.7.1 Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud .....	82
2.2.6.7.2 Libro blanco de la UE para una estrategia europea sobre problemas de salud relacionados con la alimentación, el sobrepeso y la obesidad .....	83
2.2.6.7.3 Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad (NAOS).....	83
2.2.6.7.4 Programa Piloto Escolar de Referencia para la Salud y el Ejercicio contra la Obesidad (PERSEO).....	84
2.2.6.7.5 Ley 17/2011 de seguridad alimentaria y nutrición .	84
2.2.6.7.6 Plan de colaboración para la mejora de la composición de los alimentos y bebidas y otras medidas 2017-2020.....	86
2.2.7 Factores de riesgo nutricional.....	86
2.2.7.1 Ingesta excesiva de alimentos proteicos.....	87
2.2.7.2 Ingesta excesiva de grasas saturadas y ácidos grasos <i>trans</i> .....	87
2.2.7.3 Ingesta excesiva de azúcares simples .....	88
2.2.7.4 Aporte excesivo de sal.....	89
2.2.7.5 Obesidad .....	90
2.2.7.6 Alergias e intolerancias alimentarias .....	92
2.3 SUSTANCIAS CAUSANTES DE REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD ALIMENTARIA.....	92
2.3.1 Reacciones adversas a los alimentos.....	92
2.3.2 Alergias alimentarias.....	93
2.3.3 Hipersensibilidad no alérgica al gluten .....	99
2.3.4 Información y protección de la salud de los consumidores .	104
2.3.5 Métodos analíticos de detección de alérgenos en alimentos	107
2.3.5.1. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> ).....	108
2.3.5.2 Tiras de Flujo Lateral (LFD, <i>Lateral Flow Devices</i> ).....	110
2.3.5.3 Técnica <i>Radio-allergosorbent</i> (RAST) y <i>Técnica Enzyme-allergosorbent</i> (EAST) .....	111
2.3.5.4 <i>Immunoblotting</i> .....	112
2.3.5.5 <i>Dot-immunoblotting</i> ( <i>Dot-blot</i> ) .....	112
2.3.5.6 Rocket Inmunolectoforesis (RIE) .....	112
2.3.5.7 Biosensores de proteínas .....	113
2.3.5.8 <i>Microarrays</i> de proteínas .....	113
2.3.5.9 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	115
2.3.5.10 PCR-ELISA.....	115
2.3.5.11 PCR en tiempo real.....	116

	<u>Paginas</u>
2.3.5.12 Amplificación de sondas dependiente de ligadura múltiple (MLPA, <i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i> ).....	116
2.3.5.13 PCR en tiempo real acoplada con Fusión de Alta Resolución .....	117
2.3.5.14 PCR Anidada en Tubo Único (STNPCR, <i>Single Tube Nested-PCR</i> ) .....	117
2.3.5.15 Biosensores de ADN.....	117
2.3.5.16 Aptasensores .....	118
2.3.5.17 <i>Microarrays</i> de ADN.....	118
2.3.6 Validación de los métodos analíticos y criterios de aceptación	119
<b>CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS PLATOS QUE INTEGRAN LOS MENÚS INFANTILES .....</b>	<b>127</b>
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS .....	127
3.1.1 Diseño .....	127
3.1.2 Población a estudio.....	127
3.1.3 Muestreo .....	127
3.1.4 Criterios de inclusión.....	128
3.1.5 Criterios de exclusión.....	128
3.1.5 Variables de estudio.....	128
3.1.5.1 Variables cualitativas .....	129
3.1.5.2 Variables cuantitativas .....	129
3.1.6 Materiales utilizados para el análisis microbiológico .....	129
3.1.6.1 Preparación de la muestra.....	129
3.1.6.1.1 Reactivos.....	129
3.1.6.1.2 Material.....	130
3.1.6.2 Recuento de microorganismos indicadores de higiene del proceso .....	130
3.1.6.2.1 Reactivos.....	130
3.1.6.2.2 Material .....	131
3.1.6.3 Investigación de <i>Salmonella</i> spp. mediante método automatizado .....	133
3.1.6.3.1 Reactivos.....	133
3.1.6.3.2 Material .....	133
3.1.6.4 Confirmación de positivos a <i>Salmonella</i> spp. mediante método horizontal .....	134
3.1.6.4.1 Reactivos.....	134
3.1.6.4.2 Material.....	136
3.1.6.5 Recuento en placa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	136
3.1.6.5.1 Reactivos.....	136
3.1.6.5.2 Material.....	137
3.1.6.6 Investigación de <i>Cronobacter</i> spp. mediante método horizontal .....	137
3.1.6.6.1 Reactivos.....	137

	<u>Paginas</u>
3.1.6.6.2 Material.....	138
3.1.6.7 Confirmación de <i>Cronobacter</i> spp. mediante PCR en tiempo real.....	138
3.1.6.7.1 Reactivos.....	138
3.1.6.7.2 Material.....	138
3.1.7 Metodologías de análisis.....	138
3.1.7.1 Preparación de la muestra.....	139
3.1.7.2 Método automatizado para investigación de <i>Salmonella</i> spp. ....	139
3.1.7.3 Método horizontal de confirmación de positivos a <i>Salmonella</i> spp. ....	140
3.1.7.4 Método horizontal de recuento en placa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	141
3.1.7.5 Investigación de <i>Cronobacter</i> spp. ....	141
3.1.7.6 Recuento de microorganismos indicadores de higiene del proceso .....	143
3.1.8 Análisis estadístico.....	144
3.2 RESULTADOS.....	145
3.2.1 Microorganismos patógenos.....	145
3.2.2 Microorganismos indicadores de higiene del proceso .....	145
3.3 DISCUSIÓN.....	148
3.3.1 Microorganismos patógenos.....	148
3.3.2 Microorganismos indicadores de higiene del proceso .....	150
3.3.2.1 Recuento de microorganismos indicadores de higiene del proceso en función del tipo de plato y del tratamiento térmico ....	150
3.3.2.1.1 Microorganismos aerobios mesófilos totales.....	150
3.3.2.1.2 Recuento de enterobacterias .....	152
3.3.2.1.3 Recuento de coliformes totales .....	153
3.3.2.1.4 Recuento de <i>Escherichia coli</i> .....	154
3.3.2.1.5 Recuento de estafilococos coagulasa positivos....	154
3.3.2.2 Investigación de patógenos y recuento de microorganismos indicadores de higiene del proceso en los platos sin tratamiento térmico .....	156
3.3.2.2.1 Ensaladas.....	156
3.3.2.2.2 Frutas .....	158
3.3.2.3 Recuento de microorganismos indicadores de higiene del proceso en función del modelo de gestión del servicio de alimentación.....	159
3.3.2.4 Recuento de microorganismos indicadores de higiene del proceso en función de la estación del año.....	160
CAPÍTULO IV. VALORACIÓN DE LA CALIDAD NUTRICIONAL Y DIETÉTICA DE LOS MENÚS INFANTILES.....	165
4.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	165
4.1.1 Diseño .....	165

	<u>Paginas</u>
4.1.2 Descripción de la muestra .....	165
4.1.3 Análisis cuantitativo de los menús: energía y nutrientes .....	166
4.1.4 Estudio de la composición y variedad de los menús completos .....	168
4.1.5 Análisis estadístico.....	170
4.2 RESULTADOS .....	170
4.2.1 Análisis cuantitativo de los menús: energía y nutrientes .....	170
4.2.2 Estudio de la composición y variedad de los menús completos .....	178
4.3 DISCUSIÓN .....	179
4.3.1 Análisis cuantitativo de los menús: energía y nutrientes .....	179
4.3.2 Estudio de la composición y variedad de los menús completos .....	189
4.3.2.1 Frecuencia de oferta de los diferentes grupos de alimentos .....	189
4.3.2.2 Rotación mensual de alimentos .....	195
4.3.2.3 Rotación de recetas.....	196
4.3.2.4 Variedad de técnicas culinarias .....	196
4.3.2.5 Otras recomendaciones.....	197
<b>CAPÍTULO V. INVESTIGACIÓN DE SUSTANCIAS CAUSANTES DE ALERGIAS E HIPERSENSIBILIDADES NO ALÉRGICAS EN LOS MENÚS ESPECIALES .....</b>	<b>203</b>
5.1 MATERIALES Y MÉTODOS .....	203
5.1.1 Diseño .....	203
5.1.2 Población a estudio.....	203
5.1.3 Muestreo .....	204
5.1.4 Metodologías de análisis .....	205
5.1.4.1 Determinación de proteína de leche en menús especiales.....	205
5.1.4.1.1 Material.....	205
5.1.4.1.2 Reactivos.....	206
5.1.4.1.3 Método analítico .....	206
5.1.4.1.3.1 Preparación y extracción.....	207
5.1.4.1.3.2 Detección y cuantificación.....	207
5.1.4.2 Determinación de proteína de huevo en menús especiales.....	208
5.1.4.2.1 Material.....	208
5.1.4.2.2 Reactivos.....	208
5.1.4.2.3 Método analítico .....	208
5.1.4.2.3.1 Preparación y extracción.....	209
5.1.4.2.3.2 Detección y cuantificación.....	209
5.1.4.3 Determinación de gluten en menús especiales .....	209
5.1.4.3.1 Material.....	209
5.1.4.3.2 Reactivos.....	210
5.1.4.3.3 Método analítico .....	210
5.1.4.3.3.1 Preparación y extracción.....	211
5.1.4.3.3.2 Detección y cuantificación.....	211

	<u>Paginas</u>
5.1.5 Control de calidad de las metodologías de análisis.....	212
5.1.5.1 Comprobación de la curva de calibrado .....	212
5.1.5.2 Estudio de la exactitud.....	212
5.1.5.3 Estudio de la precisión.....	214
5.1.6 Análisis estadístico.....	214
5.2 RESULTADOS .....	215
5.2.1 Detección y cuantificación de proteína de leche, proteína de huevo y de gluten en los menús especiales .....	215
5.2.2 Control de calidad de las metodologías de análisis.....	215
5.2.2.1 Comprobación de la curva de calibrado .....	215
5.2.2.2 Estudio de la exactitud.....	216
5.2.2.3 Estudio de la precisión.....	217
5.3 DISCUSIÓN .....	218
5.3.1 Detección y cuantificación de proteína de leche, proteína de huevo y de gluten en los menús especiales .....	219
5.3.2 Control de calidad de las metodologías de análisis.....	220
5.3.2.1 Comprobación de la curva de calibrado .....	221
5.3.1.2 Estudio de la exactitud.....	221
5.3.1.3 Estudio de la precisión.....	223
<b>CAPÍTULO VI. CONTRIBUCIÓN A LA EVALUACIÓN DEL RIESGO Y PROPUESTA DE MEDIDAS PARA LA MEJORA DE LA GESTIÓN DEL RIESGO .....</b>	<b>229</b>
6.1 PROPUESTA DE MEDIDAS PARA LA MEJORA DE LA GES- TIÓN DE RIESGOS MICROBIOLÓGICOS.....	230
6.1.1 Medidas propuestas para el operador de la empresa (auto- control): .....	231
6.1.2 Medidas propuestas para el control oficial:.....	231
6.2 PROPUESTA DE MEDIDAS PARA LA MEJORA DE LA GES- TIÓN DE RIESGOS NUTRICIONALES .....	231
6.2.1 Medidas propuestas para el operador de la empresa (auto- control): .....	232
6.3 PROPUESTA DE MEDIDAS PARA LA MEJORA DE LA GES- TIÓN DE RIESGOS DE SUSTANCIAS QUE CAUSAN HIPER- SENSIBILIDAD ALIMENTARIA.....	232
6.3.1 Medidas propuestas para el operador de la empresa (auto- control): .....	233
6.3.2 Medidas propuestas para el control oficial:.....	233
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>237</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>241</b>
<b>REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS.....</b>	<b>245</b>
<b>REFERENCIAS LEGALES.....</b>	<b>291</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>295</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

---



## ÍNDICE DE TABLAS

	<u>Paginas</u>
<b>Tabla 1.</b> Límites microbiológicos de referencia (log UFC/g) de los indicadores de higiene del proceso para definir la aceptación de las muestras de alimentos (Tonucci <i>et al.</i> , 2005).....	29
<b>Tabla 2.</b> Métodos de referencia de los criterios de seguridad alimentaria y criterios de higiene del proceso.....	36
<b>Tabla 3.</b> Tablas y bases de datos de composición de alimentos publicados en España (1990-2010).....	51
<b>Tabla 4.</b> Principales programas nutricionales españoles y origen de sus datos.....	52
<b>Tabla 5.</b> Objetivos nutricionales para la población española. Consenso de la Sociedad Española de Nutrición Alimentaria (Serra y Aranceta, 2011).....	54
<b>Tabla 6.</b> Ingesta adecuada de agua para la población preescolar (EFSA, 2010a). .....	55
<b>Tabla 7.</b> Propiedades y funciones de las vitaminas hidrosolubles (Kraemer <i>et al.</i> , 2012; Ortega <i>et al.</i> , 2014a; De Burgos <i>et al.</i> , 2017). .....	61
<b>Tabla 8.</b> Propiedades y fuentes de las vitaminas liposolubles (Ortega <i>et al.</i> , 2010; Kraemer <i>et al.</i> , 2012; Ortega <i>et al.</i> , 2014a; De Burgos <i>et al.</i> , 2017). .....	62
<b>Tabla 9.</b> Ingesta dietética de referencia para vitaminas (FNB, 2000)..	63
<b>Tabla 10.</b> Propiedades y fuentes de los minerales (Ortega <i>et al.</i> , 2014a; De Burgos <i>et al.</i> , 2017). .....	64
<b>Tabla 11.</b> Ingestas dietéticas recomendadas para minerales (FNB, 2000).....	65
<b>Tabla 12.</b> Recomendaciones del tamaño de las raciones de grupos de alimentos para población escolar (MISACO, 2008; MSPSI, 2010)..	73
<b>Tabla 13.</b> Calendario orientativo de incorporación de alimentos. ....	75
<b>Tabla 14.</b> Frecuencia recomendada de consumo para cada grupo de alimentos y actividad física en lactantes (6-12 meses) (BOCM, 2018a).....	76
<b>Tabla 15.</b> Ejemplo de menú diario para niños menores de 8 a 12 meses (Manera y Salvador, 2016). .....	77
<b>Tabla 16.</b> Frecuencia recomendada de consumo para cada grupo de alimentos y actividades física en preescolares (1-3 años) (BOCM, 2018b).....	78

	<u>Paginas</u>
<b>Tabla 17.</b> Ejemplo de menú diario para niños de 1 a 3 años (Manera y Salvador, 2016). .....	79
<b>Tabla 18.</b> Ejemplo de menú de comida escolar semanal para lactantes (6-12 meses) (BOCM, 2018a). .....	81
<b>Tabla 19.</b> Ejemplo de programación semanal de menús escolares para preescolares (1-3 años) (BOCM, 2018b). .....	82
<b>Tabla 20.</b> Guías Prácticas para centros de educación infantil. ....	85
<b>Tabla 21.</b> El PODER de las políticas alimentaria (Royo-Bordonada et al., 2019). .....	86
<b>Tabla 22.</b> Principales alérgenos alimentarios.....	94
<b>Tabla 23.</b> Sustancias y productos que causan reacciones de hipersensibilidad alimentaria a declarar en el etiquetado. ....	105
<b>Tabla 24.</b> Métodos analíticos directos e indirectos para la detección y cuantificación de alérgenos en los alimentos.....	107
<b>Tabla 25.</b> Proveedores de kits (ELISA, LFD y PCR) para alérgenos alimentarios. ....	119
<b>Tabla 26.</b> Fiabilidad de los resultados analíticos de alérgenos alimentarios y gluten. ....	122
<b>Tabla 27.</b> Número de muestras (n) analizadas según el tipo de plato, tratamiento térmico, modelo de gestión y estación del año. ....	128
<b>Tabla 28.</b> Composición del agua de peptona tamponada.....	130
<b>Tabla 29.</b> Composición, en g/l, de solución reconstituida de los medios de cultivo TEMPO®. ....	131
<b>Tabla 30.</b> Composición, en g/l, del caldo de cultivo selectivo SX2®....	133
<b>Tabla 31.</b> Composición, en g/l, del medio de cultivo selectivo Hektoen. ....	134
<b>Tabla 32.</b> Composición, en g/l, del medio de cultivo selectivo XLD.....	134
<b>Tabla 33.</b> Composición, en g/l, del medio de cultivo agar nutritivo. ....	135
<b>Tabla 34.</b> Composición, en g/l, del medio de cultivo agar urea.....	135
<b>Tabla 36.</b> Composición, en g/l, del medio de cultivo listo para su uso ALOA.....	136
<b>Tabla 37.</b> Composición, en g/l, del caldo de cultivo selectivo CSB.....	137
<b>Tabla 39.</b> Métodos analíticos utilizados para cada parámetro. ....	139
<b>Tabla 41.</b> Prevalencia de muestras positivas y aceptables y recuentos (log UFC/g) de los microorganismos indicadores (n=318). ....	145

	<u>Paginas</u>
<b>Tabla 42.</b> Relación de muestras no aceptables en función del tipo de plato, tratamiento térmico, modelo de gestión y estación del año. ...	145
<b>Tabla 43.</b> Prevalencia de muestras positivas y recuentos (log UFC/g) de microorganismos indicadores de higiene del proceso según el tipo de plato.....	146
<b>Tabla 44.</b> Prevalencia de muestras positivas y recuentos (log UFC/g) de microorganismos indicadores de higiene del proceso según el tratamiento térmico. ....	147
<b>Tabla 45.</b> Prevalencia de muestras positivas y recuentos (log UFC/g) de microorganismos indicadores de higiene del proceso según el modelo de gestión.....	147
<b>Tabla 46.</b> Prevalencia y recuentos (log UFC/g) de microorganismos indicadores de higiene del proceso según la estación del año.....	148
<b>Tabla 47.</b> Menús de iniciación.....	166
<b>Tabla 48.</b> Estructura ideal de un menú saludable (MISACO, 2018). ...	166
<b>Tabla 50.</b> Recomendaciones para evaluar el perfil calórico (MISACO, 2008). ....	168
<b>Tabla 51.</b> Objetivos nutricionales para evaluar el perfil lipídico. ....	168
<b>Tabla 52.</b> Objetivos nutricionales para valorar la calidad de la grasa (Serra y Aranceta, 2011). ....	168
<b>Tabla 53.</b> Frecuencias de consumo recomendadas en los menús de los centros educativos (MSPSI, 2010). ....	169
<b>Tabla 54.</b> Número de alimentos distintos por grupo y número de procesos culinarios distintos por grupo ofertados al mes (MISACO, 2008). ....	170
<b>Tabla 55.</b> Contenido de energía y macronutrientes, colesterol y fibra de los menús de iniciación según el modelo de gestión. ....	171
<b>Tabla 56.</b> Contenido de energía y macronutrientes de los menús completos según el modelo de gestión.....	171
<b>Tabla 57.</b> Contribución (%) a las necesidades diarias de energía, por meses, de los menús completos según el modelo de gestión.....	172
<b>Tabla 59.</b> Contenido de vitaminas (mg o µg) de los menús completos según el modelo de gestión. ....	173
<b>Tabla 60.</b> Contenido de minerales (mg o µg) de los menús de iniciación según el modelo de gestión.....	174
<b>Tabla 61.</b> Contenido de minerales (mg o µg) de los menús completos según el modelo de gestión. ....	175

	<u>Paginas</u>
<b>Tabla 62.</b> Indicadores de la calidad de los menús de iniciación (perfil calórico, perfil lipídico y calidad de la grasa) según el modelo de gestión.....	176
<b>Tabla 63.</b> Indicadores de la calidad de los menús completos (perfil calórico, perfil lipídico y calidad de la grasa) según el modelo de gestión.....	177
<b>Tabla 64.</b> Consumo por grupos de alimentos (número medio de raciones/mes) y porcentaje de ciclos de menús que cumplen las recomendaciones del DoCACE (MSPSI, 2010) según el modelo de gestión.....	178
<b>Tabla 65.</b> Número de incumplimientos por repeticiones entre semanas de la misma receta en las cocinas de gestión directa.....	179
<b>Tabla 66.</b> Número de muestras (n) de cada menú especial. ....	205
<b>Tabla 67.</b> Valores de referencia de los materiales de referencia Moni-QA (mg/kg de proteína láctea). ....	213
<b>Tabla 68.</b> Valores de referencia de los materiales de referencia FAPAS (en mg/kg). ....	213
<b>Tabla 69.</b> Número de determinaciones realizadas con cada material de referencia para determinar la exactitud de cada tipo de ensayo.	214
<b>Tabla 70.</b> Muestras positivas y concentración de las sustancias estudiadas que causan alergias o hipersensibilidades no alérgicas alimentarias. ....	215
<b>Tabla 71.</b> Resultados del estudio de comprobación de la curva de calibración.....	215
<b>Tabla 72.</b> Cantidad (mg/kg), porcentaje de recuperación y cumplimiento del criterio de exactitud de cada ensayo según el material de referencia empleado. ....	216
<b>Tabla 73.</b> Media de coeficiente de variación según el tipo de ensayo y estándar. ....	217
<b>Tabla 74.</b> Media de coeficiente de variación según el tipo de ensayo y material de referencia. ....	218

## INDICE DE FIGURAS

---



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Paginas</u>
<b>Figura 1.</b> Casos de <i>Salmonella</i> en el período 2010-2016 (ISCIII, 2018) .....	23
<b>Figura 2.</b> Distribución por año de los aislamientos de <i>Salmonella</i> no tifoidea notificados al SIM en el período 2000-2016 (ISCIII, 2017)..	24
<b>Figura 3.</b> Distribución por año de los casos por <i>Listeria monocytogenes</i> (2000-2016) (ISCIII, 2017) .....	27
<b>Figura 4.</b> Tasas de incidencia media de listeriosis según la edad y el sexo (2015-2018) (ISCIII, 2019).....	27
<b>Figura 5.</b> Pirámide de la alimentación saludable (Aranceta-Bartrina, 2019).....	46
<b>Figura 6.</b> Pirámide de la alimentación saludable en niños y adolescentes (Aranceta-Bartrina, 2019) .....	53
<b>Figura 7.</b> El plato ideal (SEEDO/SEEN, 2012).....	53
<b>Figura 8.</b> Nueva Pirámide de la Alimentación y la Actividad Física de la Estrategia NAOS (AESAN, 2010b) .....	71
<b>Figura 9.</b> Clasificación de las hipersensibilidades a alimentos de la EAACI, refrendada por la WAO (Johansson <i>et al.</i> , 2004).....	93
<b>Figura 10.</b> Nomenclatura y clasificación de los trastornos provocados por el gluten (Sapone <i>et al.</i> , 2012).....	100
<b>Figura 11.</b> ELISA competitivo (Schubert-Ullrich <i>et al.</i> , 2009).....	109
<b>Figura 12.</b> Diagrama de un dispositivo de flujo lateral (Schubert-Ullrich <i>et al.</i> , 2009) .....	110
<b>Figura 13.</b> Técnica Radio-allegosorbent (RAST) (Iqbal <i>et al.</i> , 2018)...	111
<b>Figura 14.</b> Unidad de llenado TEMPO® de bioMérieux®.....	132
<b>Figura 15.</b> Unidad de lectura TEMPO® de bioMérieux®.....	132
<b>Figura 16.</b> Equipo miniVIDAS® de bioMérieux® .....	133
<b>Figura 17.</b> Número de raciones ofertadas de primeros platos según el modelo de gestión .....	189
<b>Figura 18.</b> Número de raciones ofertadas de segundos platos según el modelo de gestión .....	191
<b>Figura 19.</b> Número de raciones ofertadas de guarniciones y postres según el modelo de gestión .....	192

	<u>Paginas</u>
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de hipersensibilidad a la leche, al huevo y al gluten entre el número total de diagnosticados con alguna de esas hipersensibilidades.....	204
<b>Figura 21.</b> Distribución de los casos por edad y distribución de los casos por sexo .....	204

## LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

---



## LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

AECOSAN	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
AEP	Asociación Española de Pediatría
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ALADINO	Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad
ALOA	<i>Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti</i>
AMT	Aerobios mesófilos totales
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Asociación de Químicos Analistas Oficiales)
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico
BC	<i>Bacillus cereus</i>
BDCA	Base de datos de composición de alimentos
BEDCA	Base de datos española de composición de alimentos
CC. AA.	Comunidades Autónomas
CE	Comisión Europea
CEI	Centro de educación infantil
CEMILVETDEF	Centro Militar de Veterinaria de la Defensa
CESNID	Centro de Enseñanza Superior de Nutrición y Dietética
CNA	Centro Nacional de Alimentación
COMES	Comedores escolares
CSR	Clostridios sulfito reductores
CT	Coliformes totales
CV	Coefficiente de variación
DE	Desviación estándar
DoCACE	Documento de Consenso sobre la Alimentación en los Centros Educativos
EAACI	<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i> (Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica)
EB	Enterobacterias
EC	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> (Centro Europeo para el Control y Prevención de las Enfermedades)

ECP	Estafilococos coagulasa positivos
EE. MM.	Estados Miembros
EE. UU.	Estados Unidos
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
ENT	Enfermedades no transmisibles
EQ-MEs	Equilibrio de los menús escolares
EsNuPI	Estudio Nutricional en Población Infantil Española
ESPGHAN	<i>European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition</i> (Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FESNAD	Federación Española de Sociedades Científicas de Alimentación y Nutrición
FNB	<i>Food and Nutrition Board</i> (Comité de Nutrición de la Academia Americana de Medicina)
GC	Gestión contratada
GD	Gestión directa
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidad)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno leucocitario humano)
HPA	<i>Health Protection Agency</i> (Agencia de Protección de la Salud)
IA	Ingesta adecuada
IGESANDEF	Inspección General de Sanidad de la Defensa
IMC	Índice de masa corporal
IR	Ingestas recomendadas
ISCIII	Instituto de Salud Carlos III
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Organización Internacional de Normalización)
LFD	<i>Lateral Flow Devices</i> (Tiras de Flujo Lateral)
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> (Lipoproteína de baja densidad)
LPC	Listos para el consumo
MEFP	Ministerio de Educación y Formación Profesional
MISACO	Ministerio de Sanidad y Consumo
MoniQA	<i>Monitor Quality Assurance</i>
MR	Material de referencia
MRC	Material de referencia certificado

MSCBS	Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social
MSPSI	Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad
NAOS	Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad
NAS	<i>National Academies of Sciences, Engineering and Medicine</i> (Academias Nacionales de Ciencias, Ingeniería y Medicina)
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología)
NMP	Número más probable
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
p	Valor de significación
p. ej.	Por ejemplo
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PERSEO	Programa Piloto Escolar de Referencia para la Salud y el Ejercicio contra la Obesidad
RAA	Reacción adversa a los alimentos
RDA	<i>Recommended Dietary Allowances</i> (Ingestas dietéticas recomendadas)
SENC	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
SIM	Sistema de Información Microbiológica
STD	Estándar
STEC	<i>E. coli</i> productora de toxina shiga
TCA	Tablas de composición de alimentos
tTG	Transglutaminasa tisular-2
UE	Unión Europea
UL	<i>Upper Intake Level</i> (Límite superior de ingesta tolerable)
USDA	<i>The United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura de Estados Unidos)
WAO	<i>World Allergy Organization</i> (Organización Mundial de Alergia)



## RESUMEN

---



## RESUMEN

Los cambios de estilos de vida acontecidos en las últimas décadas han motivado que numerosas familias tengan que recurrir a centros de educación infantil y sus comedores. El personal de las Fuerzas Armadas no es ajeno a esta nueva realidad social, por lo que el Ministerio de Defensa cuenta con centros de educación infantil donde niños entre los 6 meses y los 3 años de edad realizan la comida principal del día.

La población infantil es más vulnerable a las enfermedades de transmisión alimentaria que otros grupos demográficos. Por otro lado, los niños pueden padecer obesidad infantil como consecuencia de una dieta desequilibrada y hábitos alimentarios inadecuados, lo que aumenta la probabilidad de desarrollar enfermedades no transmisibles a edades más tempranas. Además, las reacciones de hipersensibilidad alimentaria han aumentado en los últimos años, convirtiéndose en la segunda causa de alertas alimentarias notificadas en España por detrás de la presencia de microorganismos patógenos.

Por tanto, el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar la seguridad alimentaria de los menús servidos en los comedores de los centros de educación infantil adscritos al Ministerio de Defensa. Para ello, se ha evaluado en los menús la calidad microbiológica, la calidad nutricional y la presencia de las sustancias causantes de hipersensibilidades alimentarias de mayor prevalencia en edad infantil.

Se investigó la presencia de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Cronobacter* spp., y se realizó el recuento de los microorganismos indicadores de higiene del proceso (aerobios mesófilos totales, enterobacterias, coliformes totales, *Escherichia coli* y estafilococos coagulasa positivos) en 318 muestras compuestas por el menú de iniciación a base de purés y el menú completo formado por un primer plato, segundo plato y postre de cinco días consecutivos provenientes de 17 guarderías.

Para la evaluación nutricional y dietética, se analizaron 226 menús completos de gestión directa y 222 menús completos de *catering* durante el año 2017. También se analizaron los menús de iniciación a base de purés para niños menores de un año. Se estudió el aporte energético, la contribución energética de los macronutrientes, el aporte de micronutrientes, el perfil lipídico y calidad de la grasa, transformando la composición de los menús (ingredientes y gramajes) mediante el programa nutricional DIAL® y comparándolos con las Tablas de Composición de Alimentos. Además, se evaluó la frecuencia de consumo de los distintos grupos de alimentos y la rotación de los alimentos de cada grupo, la variedad de las recetas y de las técnicas culinarias, según las recomendaciones del DoCACE y del Programa PERSEO.

Por último, se analizaron 133 muestras de los menús especiales libres de proteína de leche, de proteína de huevo o de gluten con kits comerciales de ELI-

SA (R-Biopharm), siguiendo la metodología indicada por el fabricante. Para evaluar la fiabilidad del método analítico y comparabilidad de los resultados se comprobó la curva de calibrado, la exactitud y la precisión bajo los criterios de aceptación establecidos por el laboratorio de referencia nacional.

En ninguna de las muestras analizadas se detectaron *Salmonella* spp. ni *Listeria monocytogenes*. *Cronobacter* spp. se aisló en la guarnición de ensalada de un segundo plato. Respecto a los microorganismos indicadores de higiene del proceso, el 96% de las muestras fueron aceptables. En los platos sin tratamiento térmico (frutas, verduras y otras hortalizas) se encontraron recuentos de aerobios mesófilos totales, enterobacterias y coliformes totales significativamente mayores. No se encontraron diferencias significativas entre los modelos de gestión. La estación del año con mayor prevalencia de muestras positivas y recuento de los microorganismos indicadores estudiados fue otoño.

El aporte energético de los menús fue adecuado, a excepción de los menús de iniciación de gestión directa (26,05% energía total diaria), aunque se debe equilibrar el exceso de proteínas y grasas con el déficit de hidratos de carbono, especialmente en ambos menús de gestión contratada. La mayor parte de las ingestas medias de los micronutrientes fueron adecuadas, incluso algunas vitaminas y minerales superaron las ingestas recomendadas diarias. El aporte de vitamina D fue escaso tanto en los menús de iniciación como en los completos de ambas modalidades de gestión. Es necesario aumentar el número de raciones mensuales de arroz, ensaladas y frutas, así como de pescados y huevos en detrimento de la carne en el modelo de gestión contratada. La rotación en el grupo de los pescados no cumplió las recomendaciones y la escasez de pescado azul fue manifiesta. Se repitieron varias recetas en los menús de gestión directa y la variedad de técnicas culinarias se ajustó a lo recomendado.

La presencia de sustancias que pueden causar reacciones de hipersensibilidad alimentaria fue muy baja (1,50%) en los menús especiales servidos (proteína de leche en un menú especial sin leche y gluten en un menú para celíacos). En cuanto a la metodología utilizada, la mayoría de los ensayos cumplieron con los criterios de aceptación de la curva de calibrado (91,4%), exactitud (74,2%) y precisión (86,9%) por lo que el método analítico se considera apropiado. Sin embargo, son necesarios más estudios de recuperación, especialmente para la determinación de proteína de leche que resultó ser el método menos exacto cuando se emplearon los materiales de referencia Mo-niQA.

Nuestros resultados revelan un elevado grado de seguridad en los menús servidos en los centros de educación infantil del Ministerio de Defensa y proporcionan datos objetivos para propuestas de mejora y metodologías contrastadas para futuras investigaciones.

## SUMMARY

---



## SUMMARY

Changing lifestyles in the last decades have led many families to resort to childcare facilities. Armed Forces personnel is no stranger to this new social reality, which is why the Ministry of Defense has childcare centres where children aged six months to three years eat their main meal of the day.

Child population is more vulnerable to foodborne diseases than other demographic groups. On the other hand, an unbalanced diet and inadequate eating patterns can lead to childhood obesity, increasing the likelihood of developing non-communicable diseases at a younger age. Moreover, food hypersensitivity reactions have increased in the last years, thus becoming the second cause of food alert notification in Spain, behind the presence of pathogenic microorganisms.

Therefore, the objective of this Doctoral Thesis has been to evaluate the food safety of the meals served in kindergartens run by the Spanish Ministry of Defense. For this purpose, microbiological and nutritional quality, as well as the presence of those substances with the highest prevalence causing food hypersensitivity in young children have been evaluated in the menus.

The presence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Cronobacter* spp. was investigated and hygiene indicator microorganisms (total mesophilic aerobes, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, total coliforms and coagulase-positive staphylococci) were counted in 318 food samples. These samples consisted of the initiation menu and the complete menu composed of first and second course and dessert on five consecutive days, which were sampled in 17 nurseries.

For the dietetic and nutritional assessment, 226 complete menus, which were directly prepared in those nurseries with kitchen, and 222 catered menus were analyzed in 2017. Menus based on purées for infants under the age of one were also analyzed. Energy intake, macronutrients distribution range, micronutrients intake, lipid profile and the quality of dietary fat were studied, converting food composition (ingredients and weights) by the DIAL® nutritional software and comparing to Food Composition Tables. Moreover, different food groups monthly frequency, the food rotation in each group and the variety of the recipes and cooking techniques were also evaluated according to DoCACE and PERSEO recommendations.

Finally, 133 samples of cow's milk protein free, egg protein free or gluten-free special menus were analyzed using commercial ELISA test kits (R-Biopharm) according to the manufacturer's instructions. To evaluate the reliability of the analytical method and comparability of the results, calibration curve, accuracy and precision were checked following the acceptance criteria established by the National Reference Laboratory.

No *Salmonella* spp. or *Listeria monocytogenes* were isolated from any of the samples. *Cronobacter* spp. was isolated in a second plate fresh salad. Regarding the hygiene indicator microorganisms, 96% of the samples showed acceptable results. Statistically significant differences were observed in the total mesophilic aerobes, *Enterobacteriaceae* and total coliforms counts of the non-heat-treated meals (fruits, salads and other vegetables). No statistically significant differences were found between management models. Autumn was the season that showed the highest positive samples prevalence and counts of the indicator microorganisms.

The energy intake was appropriate, except for catered menus for infants (26,5% of the daily energy requirements), but the excess of protein and fat contribution must be adjusted for the benefit of carbohydrates contribution, particularly in both catered menus. Micronutrients intakes were overall adequate, and some vitamins and minerals exceeded the daily intake recommended. Vitamin D intake was scarce both in infant menus and menus for young children in both management models. It is necessary to increase the rations of rice, salads and fruits, as well as fish and eggs at the expense of meat in catered menus. Fish rotation did not comply with the recommendations, particularly in fatty fish. Several recipes of the direct management model were repeated and the variety in culinary techniques responded to the recommendations.

The presence of substances causing food hypersensitivity reactions was very low (1,50%) in the special menus analyzed (cow's milk protein in one of the milk-free menu and gluten in one of the gluten-free menu). In terms of the methodology used, Most assays met the calibration curve (91,4%), accuracy (74,2%) and precisión (86,9%) acceptance criteria, so the analytical method is considered appropriate. However, more recovery studies are necessary, especially to determine the presence of cow's milk protein since it was the method with the least accuracy when using MoniQA reference material.

Our results reveal a high level of food safety in the menus served in the Spanish Ministry of Defense kindergartens and provide objective data for improving proposals and proven methodologies applicable in future researches.

## CAPÍTULO I

---

### JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



## CAPÍTULO I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La seguridad alimentaria, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), existe cuando todas las personas tienen acceso físico, social y económico permanente a alimentos seguros, nutritivos y en cantidad suficiente para satisfacer sus requerimientos nutricionales y preferencias alimentarias, y así poder llevar una vida activa y saludable (FAO, 1996).

Esta definición toma mayor relevancia si las personas de las que se trata son niños de corta edad. Así, el artículo 24 de la Convención de los Derechos del Niño de las Naciones Unidas de 1989, señala que los niños tienen que disfrutar del nivel más alto posible de salud para lo que se adoptarán, entre otras medidas, aquellas destinadas para el suministro de alimentos nutritivos adecuados y agua potable salubre, teniendo en cuenta los peligros y riesgos de contaminación del medio ambiente (ONU, 1989).

La primera etapa educativa del niño se denomina Educación Infantil y abarca dos ciclos: el primero, que comprende de los 0 a los 3 años, y el segundo desde los 3 a los 6 años de edad. En España, el número de alumnos matriculados en el primer ciclo de Educación Infantil casi se ha triplicado en diez años, según datos del curso 2017/2018 publicados por el Ministerio de Educación y Formación Profesional (MEFP) (MEFP, 2020).

El objetivo de la Educación Infantil es contribuir al pleno desarrollo del niño en todas sus capacidades físicas, afectivas, intelectuales y sociales. A ello contribuye el comedor escolar satisfaciendo sus necesidades básicas de alimentación y la adquisición de algunos hábitos y normas básicas de alimentación (Ávila y Valero, 2015). En la sociedad actual, gran parte de los niños se ven obligados a realizar la comida principal del día en un centro escolar. El 64,3% de los centros de educación infantil (CEI) públicos y el 75,5% de los privados disponían de comedor escolar en el curso 2017/2018 (MEFP, 2020).

Actualmente hay 25 CEI dependientes de Unidades, Centros y Organismos del Ministerio de Defensa, dirigidos a la educación infantil de primer ciclo para niños con edades comprendidas entre los 6 meses y los 3 años. El servicio de alimentación está adjudicado a una única empresa que gestiona de manera integral la alimentación, ya sea mediante la elaboración de comidas en las propias cocinas de los CEI (gestión directa, GD) o a través de la contratación de un *catering* (gestión contratada, GC). En el curso 2017-2018 hubo 1222 usuarios de los comedores de los CEI y en el curso 2018-2019 el número fue de 1146. De los 2408 totales, 1243 eran niños (51,6%) y 1165 niñas (48,4%), con la siguiente distribución por edades: 499 individuos tenían 1 año (20,7%), 857 tenían 2 años (35,6%) y 1052 tenían 3 años (43,7%).

La población infantil es más vulnerable a las enfermedades de transmisión alimentaria que otros grupos demográficos, debido a la inmadurez de su sis-

tema inmune y al menor peso corporal, lo que reduce la dosis necesaria para provocar la infección.

Las bacterias del género *Salmonella* causan una gran variedad de enfermedades, diferenciando las fiebres tifoideas que desencadenan una enfermedad grave y las infecciones no tifoideas cuyos síndromes más frecuentes son la gastroenteritis, bacteriemia e infección local (Sánchez-Vargas *et al.*, 2011).

El último informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y del Centro Europeo para el Control y Prevención de las Enfermedades (ECDC) sobre zoonosis y brotes alimentarios, señala *Salmonella* como primera causa de brotes alimentarios en Europa y la asociación *Salmonella*-huevos como la combinación agente causal-alimento de mayor riesgo (EFSA y ECDC, 2019). En España, el último informe del Sistema de Información Microbiológica (SIM) recogía 5333 aislamientos de *Salmonella* no tifoidea, siendo el grupo de edad entre uno y cuatro años el más afectado (ISCIII, 2018).

En los últimos años se han producido en España brotes en guarderías y niños de corta edad provocados por diferentes serotipos de *Salmonella*: *S. Typhimurium*, *S. Kedougou* y *S. Poona*, que se han asociado al consumo de fórmulas infantiles (Bances *et al.*, 2007; Rodríguez-Urrego *et al.*, 2010; Román *et al.*, 2016). El consumo de este mismo tipo de alimento ha sido la causa de dos brotes notificados recientemente causados por *S. Agona* (Jourdan-da Silva *et al.*, 2018; EFSA, 2019).

*Listeria monocytogenes* es un patógeno oportunista que provoca la infección alimentaria conocida como listeriosis con una tasa de mortalidad del 20-30%. Puede provocar síntomas gastrointestinales, neurológicos y abortos en mujeres, siendo los ancianos, niños recién nacidos, mujeres embarazadas y personas inmunocomprometidas las poblaciones más sensibles. Es capaz de formar *biofilms* resistentes a productos de higienización y tolera temperaturas de refrigeración, lo que unido a su amplia ubicuidad, le permite estar presente en un amplio rango de alimentos y superficies de trabajo (Álvarez-Ordoñez *et al.*, 2015).

Desde 2014 la tendencia de los brotes de listeriosis es creciente, aunque en el año 2018 los recuentos de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (LPC) en pocas ocasiones incumplieron los criterios microbiológicos de seguridad alimentaria establecidos en Europa en el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 (EFSA y ECDC, 2019). Los grupos de alimentos LPC en los que se detectó *L. monocytogenes* fueron similares a los de años previos, presentando los mayores incumplimientos las muestras procedentes de productos de la pesca (pescado ahumado principalmente), derivados lácteos (queso de pasta semi-blanda y blanda) y productos cárnicos tratados térmicamente.

En 2015, el mayor brote de *L. monocytogenes* tuvo lugar en una guardería de Alemania, afectando a 159 niños de una guardería con una fuerte asociación con el consumo de una mezcla de alimentos (pudin de arroz) (EFSA y ECDC, 2016). Durante el año 2019, el brote más importante de *L. monocytogenes*,

con 216 casos, tuvo lugar en España asociado al consumo de carne mechada contaminada (MSCBS, 2020).

El género *Cronobacter*, anteriormente *Enterobacter* (Iversen *et al.*, 2008), tiene en la actualidad siete especies (Iversen *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2012): *C. condimenti*, *C. dublinensis*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. sakazakii*, *C. turicensis* y *C. universalis*.

*C. sakazakii* es un patógeno oportunista que provoca infecciones en bebés y niños menores de 3 años (OMS y FAO, 2008). Los brotes de origen alimentario afectan principalmente a neonatos, causándoles meningitis, enterocolitis necrotizante, bacteriemia e incluso la muerte (Arseni *et al.*, 1987; Simmons *et al.*, 1989; Lai *et al.*, 2001). Estas infecciones se han asociado principalmente al consumo de leches infantiles deshidratadas (Van Acker *et al.*, 2001; Himelright *et al.*, 2002; Caubilla-Barron *et al.*, 2007), por lo que el estudio de este microorganismo en estos productos ha sido intenso.

Sin embargo, Iversen y Forsythe (2004) aislaron *C. sakazakii* en un amplio rango de alimentos como vegetales, carnes, quesos, hierbas y especias. La revisión realizada por Friedemann (2007) de las publicaciones sobre la presencia de *C. sakazakii* en comidas y bebidas diferentes a fórmulas infantiles en polvo, demostró la presencia de la bacteria en productos frescos, congelados, LPC, fermentados y cocinados.

Estos hallazgos, unidos a su persistencia en ambientes de producción alimentaria (Kandhai *et al.*, 2004; Mullane *et al.*, 2007), así como la descripción de infecciones causadas por este patógeno en ancianos y adultos inmunocomprometidos (Ray *et al.*, 2007; See *et al.*, 2007), han reactivado a nivel internacional la investigación de *C. sakazakii* en otros productos diferentes de las fórmulas infantiles, centrándose en alimentos LPC y en alimentos de venta al por menor (Baumgartner *et al.*, 2009; Hochel *et al.*, 2012; Akineden *et al.*, 2015; Mohammed *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015; Vojkovska *et al.*, 2016; Brandao *et al.*, 2017). En todas las investigaciones se ha detectado *C. sakazakii* en los alimentos investigados, confirmando su potencial riesgo para el consumidor.

A pesar de que los niños en edad preescolar son una población de riesgo y las guarderías han sido objeto de toxiinfecciones alimentarias hay muy pocos estudios de la calidad microbiológica sobre los menús servidos en estos centros, como manifiestan diferentes autores (Pérez-Silva *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 2003; Aguirre y Aguirre, 2013; Petruzzelli *et al.*, 2018).

Para que el funcionamiento de la restauración colectiva en los centros escolares sea adecuado, es necesaria una regulación que abarque entre otros aspectos, las normas higiénico-sanitarias de la preparación, almacenamiento y distribución de las comidas preparadas (Farré, 2015).

El Real Decreto 3484/2000 establece las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas, entre las que se encuentran las servidas en los comedores de los centros escolares.

Sin embargo, la base legal europea en seguridad alimentaria es el Reglamento (CE) n.º 178/2002 que, desde un enfoque integrado “de la granja a la mesa”, establece el análisis del riesgo y el derecho de los consumidores a disponer de alimentos seguros. Entre otras medidas, también introduce el concepto de trazabilidad y establece la responsabilidad de asegurar el cumplimiento de la legislación alimentaria por parte de las empresas alimentarias y la de organizar controles de su aplicación por las autoridades sanitarias de los Estados Miembros (EE. MM.).

Los principios de este Reglamento se vieron desarrollados por la publicación del llamado “paquete de higiene”, que rige la seguridad alimentaria en Europa desde el 1 de enero de 2006. Entre las normas que lo constituyen, destaca el Reglamento (CE) n.º 853/2004 en el que se obliga a los operadores de las empresas alimentarias a crear, aplicar y mantener procedimientos de autocontrol basados en los principios del Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC).

Estas normas legales se complementaron posteriormente con otras más específicas, entre las que destaca el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 sobre los criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos para poder ser aptos para el consumo. Esta norma, introdujo una novedad respecto al marco legal de la higiene alimentaria anterior porque con ella se establecen, además de criterios microbiológicos para productos de origen animal, criterios para productos de origen vegetal no existentes hasta su promulgación. Un segundo aspecto destacable es la diferencia que se hace entre criterios de seguridad alimentaria, cuyo incumplimiento supone la no comercialización o la retirada de los productos si están en el mercado, y criterios de higiene del proceso, cuyo incumplimiento hace que deban revisarse la higiene, los procesos o el sistema de autocontrol del establecimiento.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la obesidad infantil uno de los problemas de salud pública más graves del siglo XXI. Los niños obesos y con sobrepeso tienden a seguir siendo obesos en la edad adulta y tienen más probabilidades de padecer a edades más tempranas enfermedades no transmisibles (ENT) como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. Para hacer frente a esta epidemia, la OMS elaboró una estrategia en 2004, cuya meta general es promover y proteger la salud orientando la creación de un entorno favorable para la adopción de medidas sostenibles a escala individual, comunitaria, nacional y mundial que, en conjunto, den lugar a una reducción de la morbilidad y mortalidad asociadas a una alimentación poco sana y a la falta de actividad física (OMS, 2004).

La Comisión Europea (CE), sensibilizada también con este problema, elaboró el Libro Blanco para establecer una estrategia europea sobre problemas de salud relacionados con la alimentación, el sobrepeso y la obesidad. El documento aludía a la infancia como un período determinante para inculcar comportamientos para adoptar un estilo de vida saludable y consideraba a la escuela como el escenario de intervención donde desarrollar acciones eficaces para modificar los comportamientos a largo plazo (UE, 2007).

En este contexto, el Ministerio de Sanidad y Consumo (MISACO), a través de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), afrontó y lideró la situación de la obesidad de nuestro país con la elaboración de la Estrategia de Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad (NAOS), que tiene como finalidad mejorar los hábitos alimentarios e impulsar la práctica regular de la actividad física de todos los ciudadanos, poniendo especial atención en la prevención durante la etapa infantil (AESAN, 2005a).

Los preocupantes datos de la Encuesta Nacional de Salud de España, en 2006, relativos a la prevalencia de obesidad y sobrepeso en la infancia (los niños de entre 5 y 9 años presentaban un 15,38% de obesidad y un 21,43% de sobrepeso) (MISACO, 2006), provocaron que la AESAN promoviera el Programa Piloto Escolar de Referencia para la Salud y el Ejercicio contra la Obesidad (PERSEO), enmarcado dentro de la Estrategia NAOS, y orientado a la promoción de la alimentación y la actividad física saludable en el ámbito escolar (MISACO, 2008).

Asimismo en 2010, siguiendo las recomendaciones de la Estrategia NAOS, el Consejo Interterritorial del Sistema de Salud aprobó el Documento de Consenso sobre la Alimentación en los Centros Educativos (DoCACE). Este documento establece criterios nutricionales para los menús escolares ofertados en los centros educativos, así como las frecuencias de consumo de cada alimento recomendadas en los menús escolares (MSPSI, 2010).

La Ley 17/2011 de seguridad alimentaria y nutrición abordó la materia de nutrición, íntimamente relacionada con la salud asociada a una correcta alimentación. La ley aporta medidas especiales dirigidas al ámbito escolar para que las escuelas infantiles promuevan la enseñanza de la nutrición y alimentación, mientras que las autoridades competentes deben velar para que las comidas servidas en estos centros sean variadas, equilibradas y estén adaptadas a las necesidades nutricionales de cada grupo de edad.

Tanto las iniciativas y recomendaciones expuestas anteriormente como las exigencias legales, han promovido numerosos estudios sobre la calidad nutricional de los menús servidos en los comedores escolares de educación primaria y secundaria (Aranceta *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Zulueta *et al.*, 2011; Berradre-Sáenz *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2016). Sin embargo, como concluyeron dos estudios sobre la calidad nutricional de menús servidos en CEI, los estudios sobre las comidas servidas en comedores nacionales de CEI es escasa, a pesar de la importancia de establecer unos hábitos alimentarios adecuados desde la etapa preescolar (Seiquer *et al.*, 2016; Vergara *et al.*, 2016).

La Ley 17/2011 también aborda la elaboración en las escuelas infantiles de menús especiales adaptados para el alumnado con alergias o intolerancias alimentarias diagnosticadas por especialistas, así como menús alternativos en el caso de intolerancia al gluten.

La prevalencia de las alergias alimentarias ha aumentado en las últimas décadas en todo el mundo (Sicherer y Sampson, 2018). La revisión realizada por

Nwaru *et al.* (2014), que abarca publicaciones desde 2000 a 2012, concluyó que las alergias alimentarias afectan en Europa al 6% de la población. Los resultados indicaron que la alergia a la leche de vaca y huevo son las más frecuentes en los niños.

En España, los escasos estudios epidemiológicos sobre alergias alimentarias (Sánchez-López *et al.*, 2017; Bellón *et al.*, 2018; Ojeda *et al.*, 2018) determinaron que la leche y el huevo fueron los principales causantes de alergias en la población infantil.

La hipersensibilidad no alérgica al gluten afecta aproximadamente al 1% de la población europea (Altobelli *et al.*, 2014), oscilando entre el 1 y 3% en la población infantil (Vriezinga *et al.*, 2015).

Las alergias alimentarias pueden manifestarse desde unos síntomas leves hasta una grave anafilaxia, mientras que la manifestación clásica de la celiaquía en la infancia es una malabsorción (Lebwholg *et al.*, 2018).

Con el fin de evitar que las personas consuman alimentos que les causen reacciones de hipersensibilidad, la normativa europea obliga, desde diciembre de 2014, a destacar en el etiquetado todo aquel ingrediente o coadyuvante tecnológico que pueda causar alergias o intolerancias alimentarias (Reglamento (UE) n.o 1169/2011; Reglamento (UE) n.o 78/2014).

Por tanto, la detección y cuantificación fiables de estas sustancias que causan hipersensibilidad a alimentos es una de las prioridades de los laboratorios de control oficial. El laboratorio nacional de referencia junto a los laboratorios de control oficial de las Comunidades Autónomas (CC. AA.) trabajan para mejorar y armonizar la comparabilidad de los resultados obtenidos en los análisis de gluten y alérgenos en alimentos (CNA, 2017).

La anteriormente citada Ley 17/2011 también trata en dos de sus capítulos (III y VI) el control oficial y los laboratorios. El capítulo III establece que corresponde a las Administraciones públicas en el ámbito de sus respectivas competencias, la realización de los controles oficiales necesarios para asegurar el cumplimiento de lo previsto en la ley. El capítulo VI indica que las autoridades competentes de la Administración General del Estado deben designar los laboratorios para realizar los análisis pertinentes en materia de control oficial. Finalmente, en la disposición adicional primera de la Ley 17/2011 se establece que *“las disposiciones de esta ley, cuando afecten a las Unidades, Centros y Dependencias pertenecientes al Ministerio de Defensa y sus organismos públicos se aplicarán por sus órganos sanitarios competentes”*.

Con el fin de dar cumplimiento a lo dispuesto en dicha disposición adicional se promulgó la Orden Ministerial 11/2013 sobre actuaciones en materia de higiene y seguridad alimentaria en el ámbito de las Fuerzas Armadas. En esta Orden Ministerial se establece como autoridad sanitaria competente a la Inspección General de Sanidad de la Defensa (IGESANDEF) y se define agente de la autoridad sanitaria al oficial veterinario en el ejercicio de sus funciones

desarrollando cometidos de control oficial. También se designa laboratorio de referencia del Ministerio de Defensa en asuntos de higiene y seguridad alimentaria al Centro Militar de Veterinaria de la Defensa (CEMILVETDEF).

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar la seguridad alimentaria de los menús servidos en los comedores de los centros de educación infantil adscritos al Ministerio de Defensa, en base a los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la calidad microbiológica de los platos servidos, teniendo en cuenta criterios microbiológicos de seguridad alimentaria e higiene de los procesos establecidos por la normativa legal y la literatura científica.
2. Valorar la calidad nutricional y dietética de los menús servidos en base a las recomendaciones de organismos de referencia a nivel nacional e internacional.
3. Investigar, en los menús especiales, la presencia de las sustancias causantes de alergias e hipersensibilidades no alérgicas a los alimentos de mayor prevalencia en edad infantil.
4. Analizar los resultados obtenidos para contribuir a la evaluación del riesgo y, en su caso, proponer medidas de mejora.

El capítulo II aborda la revisión bibliográfica del tema de estudio. La metodología analítica utilizada, los resultados obtenidos y su posterior discusión de los tres primeros objetivos se describen en los capítulos III, IV y V de la presente memoria. Asimismo, el cuarto objetivo se recoge en el capítulo VI.



## **CAPÍTULO II**

---

### **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS ALIMENTOS

Los alimentos pueden vehicular microorganismos patógenos para el hombre con el consiguiente riesgo para la salud. Su presencia en los alimentos, así como la de otros microorganismos no patógenos, puede además, ser un indicador de las condiciones higiénicas del entorno alimentario y de las prácticas de manipulación.

La población infantil es más vulnerable a las enfermedades de transmisión alimentaria que otros grupos demográficos. Para garantizar la seguridad alimentaria en los CEI, la responsabilidad es compartida entre el operador económico, que debe implantar un sistema de autocontrol basado en el APPCC, y las autoridades sanitarias, que deben realizar el control oficial para verificar el cumplimiento de la normativa por parte del operador (Reglamento (CE) n.º 178/2002; Reglamento (CE) n.º 852/2004).

El análisis microbiológico de las comidas servidas en los CEI supone una herramienta eficaz, tanto para verificar la eficacia del autocontrol por parte del operador económico, como para las autoridades sanitarias en sus actividades de control oficial. El Reglamento (CE) n.º 2073/2005 establece los criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos. Por un lado, recoge los criterios de seguridad alimentaria, como por ejemplo *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Cronobacter* spp. y, por otro lado, establece criterios de higiene del proceso como pueden ser el recuento de colonias aerobias, *Enterobacteriaceae*, estafilococos coagulasa positivos y *Escherichia coli*.

#### 2.1.1 Microorganismos patógenos

##### 2.1.1.1 *Salmonella* spp.

*Salmonella* fue aislada por primera vez en el año 1885 en intestino de cerdo por el veterinario Daniel E. Salmon, quien la denominó *Bacillus cholerasuis*. En 1900, Lignières la renombró como *Salmonella cholerasuis*, en honor a su primer descubridor (Ryan *et al.*, 2017).

El sistema de nomenclatura del género *Salmonella* siempre ha sido muy complejo. El método de clasificación actual es el propuesto por Kauffman-White que clasificó a las bacterias de este género en función de sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi). Además, debido a la confusión del uso de “*choleraesuis*” tanto en especies como en serotipos, se propuso sustituir esa denominación por la de *Salmonella enterica* (Le Minor y Popoff, 1987). Finalmente, tras analizar la divergencia en el ADN, Reeves *et al.* (1989), propusieron elevar a *Salmonella enterica* subesp. *bongori* al nivel de especie.

Por tanto, actualmente, el género *Salmonella* está constituido por dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* y, a su vez, *Salmonella en-*

*terica* se divide en 6 subespecies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* y *S. enterica* subsp. *indica*, que es la clasificación propuesta por Tindall *et al.* (2005) y utilizada por la OMS y la Sociedad Americana de Microbiología. Hasta el momento, se han identificado más de 2600 serotipos del género *Salmonella*.

Las bacterias del género *Salmonella* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos mesófilos, Gram negativos, no esporulados, anaerobios facultativos, catalasa positivos, oxidasa negativos, fermentan la glucosa produciendo sulfuro de hidrógeno (excepto algunas cepas de los serotipos Paratyphi A y Cholerasuis) y móviles gracias a sus flagelos peritricos (los serotipos Pullorum y Gallinarum no son móviles) (Garrity *et al.*, 2006).

El rango de temperatura de crecimiento de *Salmonella* oscila entre 5°C y 47°C, siendo su temperatura óptima en torno a 37°C. Puede sobrevivir en un rango amplio de pH (3,8-9,5), siendo el óptimo de 6,5-7,5. Valores de  $a_w$  menores de 0,94 inhiben su crecimiento.

*Salmonella* está ampliamente distribuida en el ambiente, causando una gran variedad de enfermedades en animales y humanos. Las fiebres tifoideas causadas por *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi normalmente desencadenan una enfermedad grave que compromete la vida en países con bajos ingresos, mientras que las infecciones no tifoideas suelen ser autolimitantes y están extendidas por todo el mundo (Sánchez-Vargas *et al.*, 2011).

*Salmonella* no tifoidea se encuentra de forma natural en pollos, ovejas, cabras, cerdos, reptiles, aves, perros, gatos y en ciertos animales salvajes. Las granjas de animales son el principal reservorio en los países industrializados. Por tanto, el mecanismo de transmisión más frecuente al hombre es a través del consumo de productos de origen animal, aunque también puede darse a partir de otros productos de origen no animal, agua contaminada o por contacto con animales. Los factores de riesgo asociados a los brotes son el consumo de alimentos mal almacenados, crudos o con un tratamiento térmico insuficiente (Sánchez-Vargas *et al.*, 2011).

Los síndromes clínicos más frecuentes de la salmonelosis no tifoidea son la gastroenteritis, bacteriemia e infección local. El período de incubación es de 6-12 horas y los síntomas más comunes son náuseas, vómitos, diarrea no sanguinolenta, fiebre, dolor abdominal, mialgias, artralgias y dolor de cabeza (Sánchez-Vargas *et al.*, 2011).

El último informe de la EFSA y del ECDC sobre zoonosis y brotes alimentarios recoge que la salmonelosis es la segunda zoonosis más común por detrás de la campylobacteriosis, permaneciendo estable durante los últimos 5 años (2014-2018). Por otra parte, *Salmonella* causó en Europa la mayor parte de los brotes alimentarios (30,7%) durante 2018, principalmente originados por *Salmonella* Enteritidis y asociados al consumo de huevos y ovoproductos (EFSA y ECDC 2019).

En nuestro país, con una tasa de notificación del 33,21%, la salmonelosis no tifoidea es también la segunda causa de enfermedad de transmisión alimentaria solo por detrás de *Campylobacter* spp (50,87%). Como ocurre a nivel europeo, es la primera causa de brotes de transmisión alimentaria, siendo los huevos y derivados (79,1% de los brotes con identificación del alimento) los principales alimentos asociados a estos brotes (ISCIII, 2018).

En la Figura 1, se puede observar cómo en 2016 los casos por *Salmonella* Typhimurium continuaron con la tendencia ascendente iniciada en 2011, mientras que los causados por *Salmonella* Enteritidis aumentaron con respecto al año anterior en el que se había producido un marcado descenso (ISCIII, 2018). En la Figura 2 se representan los aislamientos de *Salmonella* no tifoidea notificados al SIM desde el año 2007 hasta el 2016, donde se puede apreciar cómo *Salmonella* Typhimurium ha superado en los últimos años a *Salmonella* Enteritidis (ISCIII, 2017), a diferencia de Europa donde el serotipo Enteritidis continúa siendo el más frecuente.

El último informe del SIM recogió 5333 aislamientos de *Salmonella* no tifoidea, siendo el grupo de edad de entre uno y cuatro años el más afectado (ISCIII, 2017). Las infecciones en niños están asociadas a guarderías infantiles y al contacto con gatos y reptiles (Younus *et al.*, 2007).

En febrero de 2004 se notificó un brote gastrointestinal en una guardería de Oviedo. La serotipificación de un total de 27 aislamientos, procedentes de 22 pacientes de entre 3 meses y 3 años, mostró que todos ellos correspondían a *Salmonella* Typhimurium. El análisis de alimentos no fue posible porque no se habían conservado desde el inicio del brote hasta su notificación. No se descartó la vía alimentaria como posible fuente de infección en los primeros casos y una diseminación fecal-oral en los casos subsecuentes (Bances *et al.*, 2007).

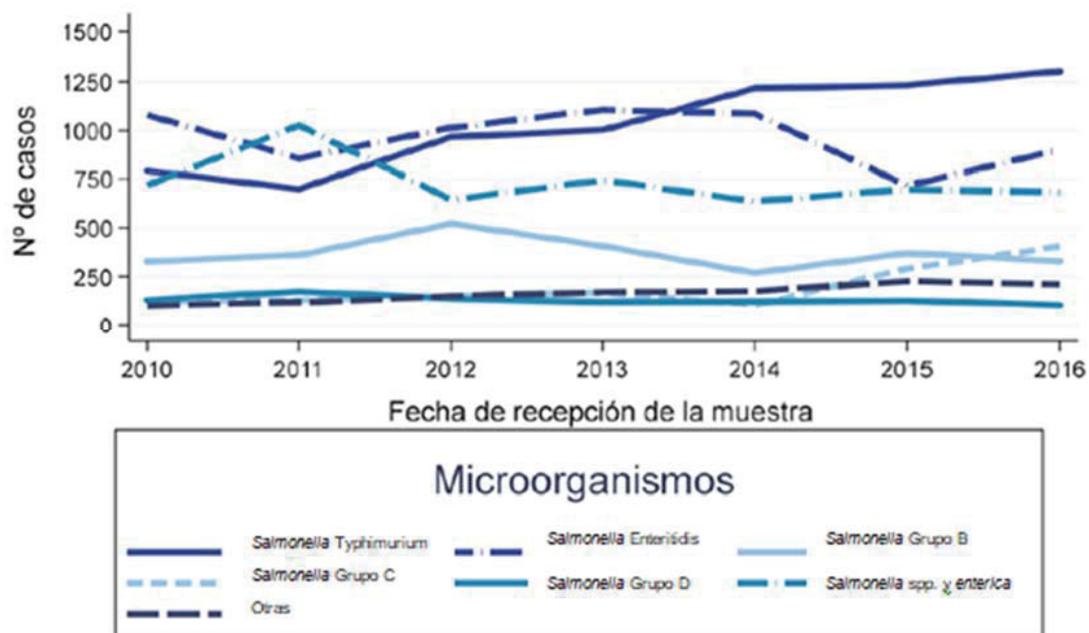
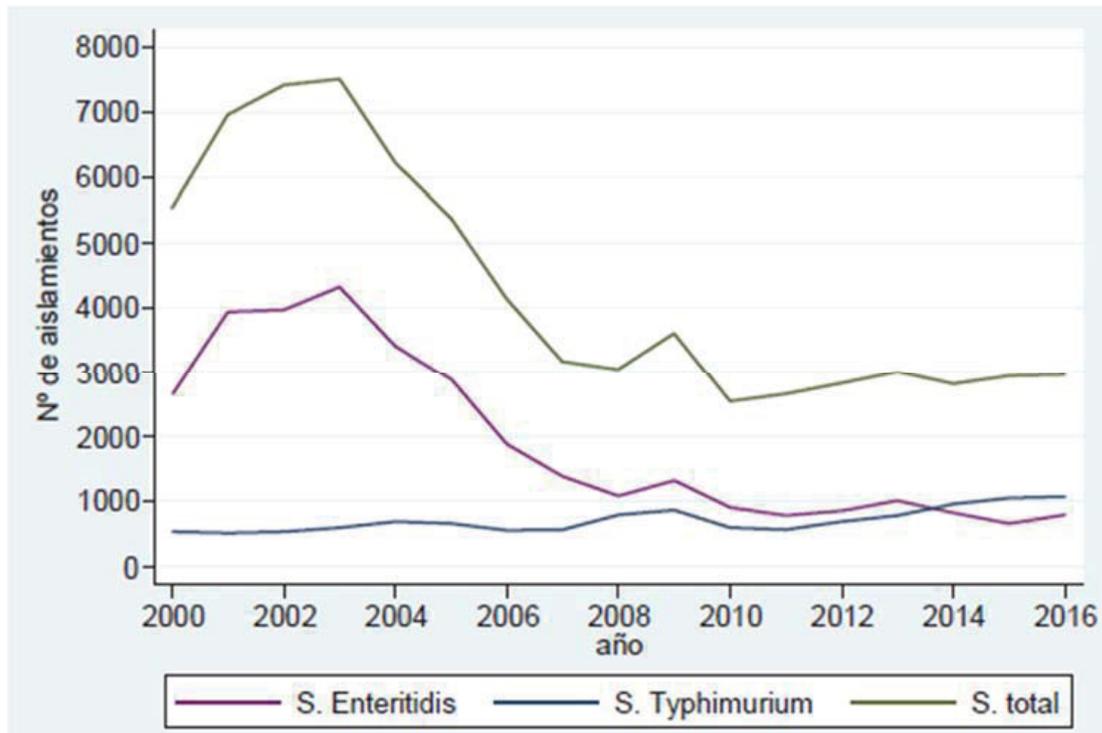


Figura 1. Casos de *Salmonella* en el período 2010-2016 (ISCIII, 2018)



**Figura 2.** Distribución por año de los aislamientos de *Salmonella* no tifoidea notificados al SIM en el período 2000-2016 (ISCIII, 2017)

Dontsenko *et al.* (2008) describieron un brote de salmonelosis en una guardería de Estonia, donde 85 de los 94 afectados fueron niños. Una sopa de pollo resultó ser el probable vehículo de infección.

En 2008, el Centro Nacional de Microbiología de España asoció al consumo de una fórmula infantil láctea un brote de *Salmonella* Kedougou. De los 21 casos notificados, 19 fueron niños menores de un año (Rodríguez-Urrego *et al.*, 2010).

Desde enero de 2010 hasta julio de 2011 se produjo un brote supracomunitario en España. El 83% de los 289 casos declarados correspondía a lactantes menores de un año. Se identificaron como vehículo de la infección del brote dos leches maternizadas producidas por la misma empresa (ISCIII, 2012). Dentro de ese brote supracomunitario, uno de los brotes de gastroenteritis tuvo lugar en una guardería de Valladolid. Los 13 casos, con edades comprendidas entre los cinco meses y los cinco años, consumieron una de las fórmulas lácteas del mismo lote implicado en el brote a nivel nacional, contaminada con *Salmonella* Poona (Román *et al.*, 2016).

Recientemente, se han notificado dos brotes por *Salmonella* Agona asociados al consumo de fórmulas infantiles. El primero afectó a 37 niños con una edad media de 4 meses a nivel nacional en Francia y dos casos fuera de sus fronteras, produciéndose uno de ellos en España. Las cinco fórmulas infantiles asociadas con los casos se fabricaron en la misma empresa francesa (Jour-

dan-da Silva *et al.*, 2018). El segundo brote se produjo en varios países, con 30 niños afectados en Francia, uno en Luxemburgo y otro en Bélgica. Otra vez *Salmonella* Poona ha sido la implicada y todos los casos consumieron fórmulas infantiles elaboradas en una empresa española que posteriormente se comercializaron por una francesa. Sin embargo, la investigación de *Salmonella* Poona ha resultado negativa en todos los lotes de los productos sospechosos fabricados en la empresa española y tampoco se ha detectado en las muestras ambientales de sus instalaciones (EFSA, 2019).

### 2.1.1.2 *Listeria monocytogenes*

Esta bacteria se describió por primera vez en 1926 por Murray tras un brote epizootico en conejos y cerdos de guinea y fue denominada *Bacterium monocytogenes* (Murray *et al.*, 1926). En 1940 pasó a denominarse *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940) que es la única especie del género patógena para el hombre y animales (Buchanan *et al.*, 2017). Otras especies del género son *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri* y *Listeria welshimeri*.

*L. monocytogenes* es un cocobacilo Gram positivo aerobio y anaerobio facultativo, no esporulado, catalasa positivo, oxidasa negativo (Ray y Bhunia, 2008). Es móvil por la presencia de hasta cinco flagelos peritricos, pero en cultivos incubados entre 20°C y 30°C se observa un descenso de la motilidad (Peel *et al.* 1988; Dons *et al.*, 1992). A 37°C se produce una represión de los flagelos, necesaria para alcanzar su máxima virulencia (Gründling *et al.*, 2004).

*L. monocytogenes* es un microorganismo psicrótrofo cuya temperatura de crecimiento oscila entre 0°C y 42°C, siendo la temperatura óptima de crecimiento entre 30°C y 37°C. Además, es capaz de sobrevivir a temperaturas de congelación en alimentos como carne, lácteos, vegetales y pescado (Ray y Bhunia, 2008). Sin embargo, es un microorganismo sensible a tratamientos térmicos, aunque la característica de ser patógeno intracelular le puede permitir resistir temperaturas de pasteurización alta (72°C durante 15 segundos), tal y como se demostró en el estudio de Doyle *et al.* (1987).

Este microorganismo puede multiplicarse en un amplio rango de pH (4,4 a 9,6), siendo el óptimo 7,0 (Lado *et al.*, 2007) y soporta concentraciones de NaCl de hasta el 10% (m/v) (Vos *et al.*, 2009). Asimismo, presenta un crecimiento óptimo con valores de  $a_w \geq 0,97$ , pudiendo multiplicarse en ambientes con  $a_w$  de 0,92, incluso sobrevivir en medios con una  $a_w$  de 0,79 (Magalhães *et al.*, 2014).

El género *Listeria* presenta una distribución muy amplia. Se ha aislado en suelos, productos vegetales, agua de bebida, aguas residuales, piensos de animales, material fecal, carne de pollo, desechos de mataderos y ambientes relacionados con el procesado de alimentos (Vos *et al.*, 2011; Henriques *et al.*, 2014).

La listeriosis humana presenta una baja incidencia, pero posee una elevada letalidad (20-30%) entre los individuos enfermos. Es especialmente grave en

grupos de riesgo como son los ancianos, embarazadas, niños de corta edad y personas inmunocomprometidas, provocando síntomas gastrointestinales, neurológicos y abortos (Lomonaco *et al.*, 2015).

*L. monocytogenes* es transmitida normalmente por el consumo de alimentos contaminados por esta bacteria (Mead *et al.*, 1999; Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007). Aunque se han relacionado casos de listeriosis con alimentos crudos (carne, pescado, vegetales, leche, etc.), los alimentos LPC son los que están más implicados en brotes y casos esporádicos.

Una de las características principales de *L. monocytogenes* es su capacidad para formar *biofilms*. Se trata de un ecosistema dinámico en el cual los microorganismos se asocian, adheridos a una superficie, y forman una matriz extracelular que les protege de factores externos (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Esta estrategia de persistencia en diferentes superficies, como acero inoxidable, polímeros de plásticos, gomas o cristal, dificulta su eliminación del entorno de procesado mediante las operaciones de limpieza y desinfección (Carpentier y Cerf, 2011). A menos de 20°C *L. monocytogenes* estimula la biosíntesis de los flagelos, que tienen un papel fundamental en la creación de *biofilms* (Vatanyoopaisarn *et al.*, 2000).

En el informe de la EFSA de 2018 los casos confirmados de listeriosis aumentaron, a pesar de que el recuento de *L. monocytogenes* en pocas ocasiones excedió los criterios de seguridad de la Unión Europea (UE) para los alimentos LPC analizados (EFSA y ECDC, 2019). La tendencia de casos confirmados en el período 2014-2018 fue ascendente, y así es previsible que continúe en 2019 cuando se añadan los datos del brote producido en España asociado al consumo de carne mechada (MSCBS, 2019). De los 216 afectados en este brote, el 57% fueron mujeres con una edad media de 45,5 años. 37 de ellas eran mujeres embarazadas (dos de ellas tuvieron aborto, tres muerte fetal y 6 parto prematuro). La edad media en hombres fue de 50 años.

Los brotes informados en Europa afectaron principalmente a mayores de 64 años (EFSA y ECDC, 2019), pero no hay que olvidar que los niños de corta edad se incluyen dentro de los grupos de riesgo. Alemania informó en 2015 del mayor brote de *L. monocytogenes* ocurrido en el país, que afectó a 159 individuos de una guardería con una fuerte asociación con el consumo de una mezcla de alimentos (pudin de arroz) (EFSA y ECDC, 2016).

La distribución de los casos de *L. monocytogenes* en nuestro país en 2000-2016 se muestra en la Figura 3, observándose un aumento de casos en 2016 respecto a los años anteriores (ISCIII, 2017). La distribución por sexo y edad para 2015-2018, siguió el patrón habitual de esta enfermedad, afectando a los grupos más vulnerables como los recién nacidos, embarazadas y ancianos (Figura 4) (ISCIII, 2019).

Otros datos de interés del informe de la EFSA, fueron el 15,6% de letalidad y la baja detección del patógeno en los controles de vigilancia en productos LPC: 2,7% en productos de la pesca, principalmente pescados ahumados

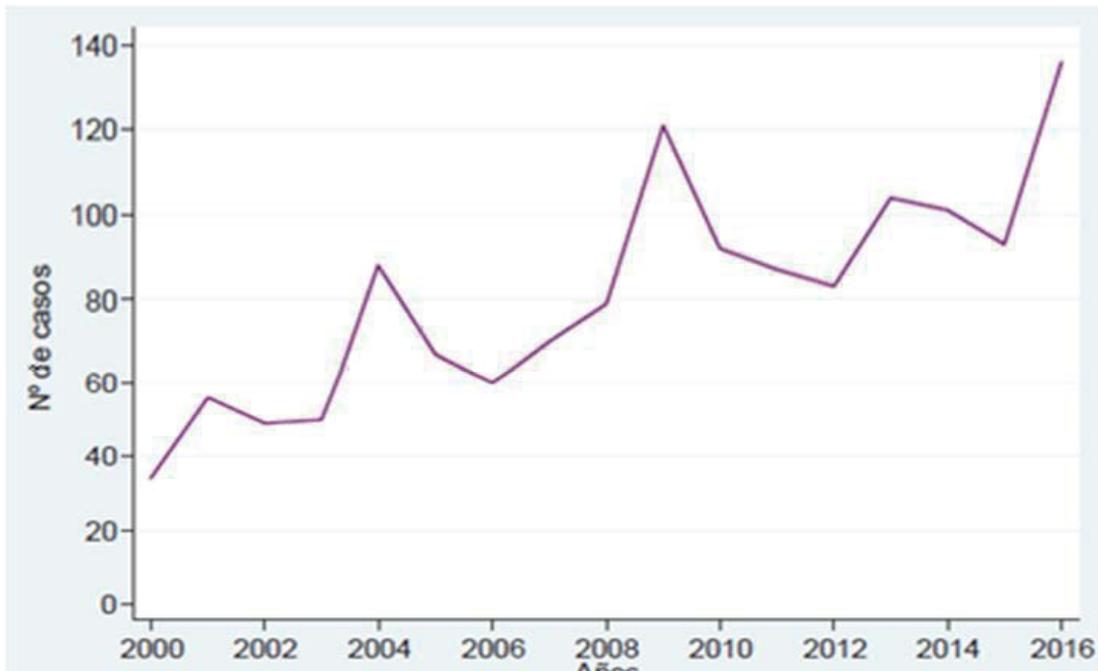


Figura 3. Distribución por año de los casos por *Listeria monocytogenes* (2000-2016) (ISCIII, 2017)

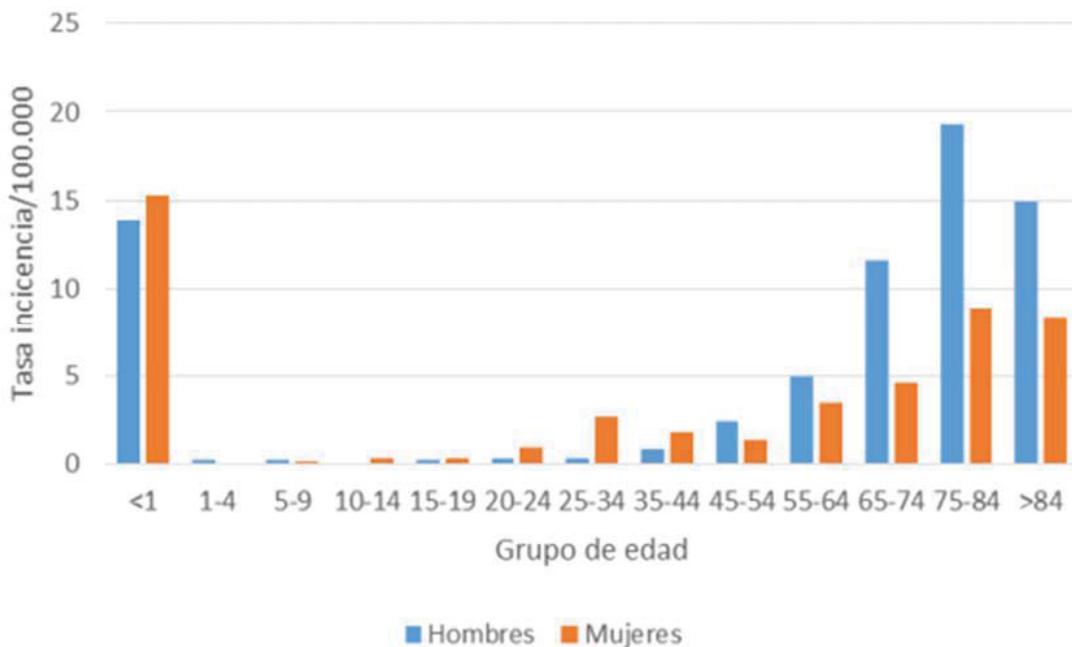


Figura 4. Tasas de incidencia media de listeriosis según la edad y el sexo (2015-2018) (ISCIII, 2019)

en frío o en caliente; 1,4% en carne y productos cárnicos; inferior al 0,8% en quesos de pasta semi-blanda y blanda, y menos del 0,5% en quesos duros (EFSA y ECDC, 2019).

Hay que destacar que los últimos casos de listeriosis en Europa (EFSA, 2018) y en otros países no europeos (Buchanan *et al.*, 2017) han sido vehiculados

por frutas y vegetales. En estos alimentos la presencia es mayor en ciertos productos como pueden ser la fruta precortada y envasada o las ensaladas LPC (Badosa *et al.*, 2008). También son de interés otros tipos de alimentos de consumo más habitual en los últimos años, como los sándwiches, platos preparados o productos de pastelería con cremas (Ricci *et al.*, 2018).

### 2.1.1.3 *Cronobacter spp.*

Esta bacteria se consideró una variante de *Enterobacter cloacae* hasta 1980, momento en el que recibió el nombre actual en honor al bacteriólogo japonés Riichi Sakazakii. En 2008, se propuso su reclasificación creando el género *Cronobacter* con 4 especies, 2 subespecies y una genomoespecie. Posteriormente, nuevas especies se han añadido al género, siendo en la actualidad siete: *C. condimenti*, *C. dublinensis*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. sakazakii*, *C. turicensis* y *C. universalis* (Iversen *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2012).

*Cronobacter* es un Gram negativo perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae*, anaerobio facultativo, no esporogénico, catalasa positivo, oxidasa negativo y móvil con flagelos peritricos. Es osmotolerante y mesófilo, con capacidad para crecer en un rango de temperaturas entre 5,5°C y 45°C. (Fiore *et al.*, 2008).

*C. sakazakii* es la especie más representativa y de interés sanitario del género *Cronobacter*. Es un patógeno oportunista que provoca infecciones en bebés y niños. Los brotes de origen alimentario afectan principalmente a neonatos causándoles septicemia, meningitis o enterocolitis necrotizante, con una mortalidad que supera el 50% (Arseni *et al.*, 1987; Simmons *et al.*, 1989; Lai, 2001). Estas infecciones se han asociado principalmente con el consumo de leches infantiles deshidratadas (Van Acker *et al.*, 2001; Himelright *et al.*, 2002; Caubilla-Barron *et al.*, 2007), por lo que su presencia en estos productos se ha estudiado profundamente.

En 2018, la prevalencia de *C. sakazakii* en las 1111 muestras de alimentos analizadas en países europeos fue del 1,5%, detectándose en una fórmula infantil deshidratada, en dos alimentos para nutrición especial para lactantes y niños y las otras 14 en leche y cereales en polvo (EFSA y ECDC, 2019).

Las fórmulas infantiles deshidratadas son consideradas la fuente y vehículo principal, pero Iversen y Forsythe (2004) aislaron *C. sakazakii* en un amplio rango de alimentos como vegetales, carnes, quesos, hierbas y especias. Asimismo, la revisión realizada por Friedemann (2007) de las publicaciones sobre la presencia de *C. sakazakii* en comidas y bebidas diferentes a fórmulas infantiles en polvo, demostró la presencia de la bacteria en productos frescos, congelados, LPC, fermentados y cocinados.

Además, *C. sakazakii* también puede causar infección en otros grupos de edad, principalmente ancianos y adultos inmunocomprometidos (Ray *et al.*, 2007; See *et al.*, 2007), aunque también se ha publicado un brote de gastroenteritis en adolescentes estudiantes (Yong *et al.*, 2018).

Otro aspecto importante en su epidemiología es su persistencia en ambientes de producción alimentaria (Kandhai *et al.*, 2004; Mullane *et al.*, 2007; Killer *et al.*, 2015). Esto es debido, en gran medida, a su habilidad para formar *biofilms* y protegerse de los factores ambientales externos (Ling *et al.*, 2020).

Todos estos nuevos enfoques en el estudio de su epidemiología han reactivado la investigación de *Cronobacter* spp. en otros productos diferentes a las fórmulas infantiles por todo el mundo. Las líneas de investigación actuales se centran en alimentos LPC y de venta al por menor (Baumgartner *et al.*, 2009; Hochel *et al.*, 2012; Akineden *et al.*, 2015; Mohammed *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015; Vojkowska *et al.*, 2016; Brandao *et al.*, 2017; Ueda, 2017; Ling *et al.*, 2018; Fei *et al.*, 2018; Vasconcellos *et al.*, 2018; Aksu *et al.*, 2019). En todos ellos se ha detectado *C. sakazakii* por lo que se confirma su potencial riesgo para el consumidor.

### 2.1.2. Microorganismos indicadores de higiene del proceso

Los indicadores de calidad microbiológica se utilizan habitualmente para evaluar la inocuidad del alimento y las condiciones generales higiénicas de un alimento o ambiente.

El Reglamento (CE) n.º 2073/2005 no establece criterios de higiene del proceso límites para las comidas preparadas. Para este tipo de alimentos se pueden emplear referencias de normativas estatales, autonómicas o locales, legislación derogada (como las normas microbiológicas del Real Decreto 3484/2000), guías de organismos públicos o del sector de la restauración colectiva o recomendaciones de la literatura científica, como por ejemplo los límites de referencia establecidos a partir de un estudio colaborativo en Italia, que se recogen en la Tabla 1 (Tonucci *et al.*, 2005).

**Tabla 1.** Límites microbiológicos de referencia (log UFC/g) de los indicadores de higiene del proceso para definir la aceptación de las muestras de alimentos (Tonucci *et al.*, 2005).

Tipo de alimento	AMT	EB	EC	ECP
Primer plato	4,0	2,7	1,0	1,7
Segundo plato (carne o pescado)	5,0	3,7	1,0	1,7
Segundo plato refrigerado	5,0	3,7	1,0	1,7
Verduras y otras hortalizas	N/A	3,0	2,0	2,7
Verduras cocinadas	5,0	2,7	1,0	1,7
Huevos fritos o cocinados	4,0	2,7	1,0	1,7
Ensalada de carne o pescado	5,5	3,0	1,0	2,0
Ensalada de pasta o arroz	5,7	3,0	1,0	2,0
Pizza	6,0	3,0	1,7	2,0
Pan	4,0	2,0	1,0	1,7

N/A: No aplica

AMT: Aerobios mesófilos totales. EB: Enterobacterias. EC: *E. coli*. ECP: Estafilococos coagulasa positivos.

### 2.1.2.1 Aerobios mesófilos totales

Este indicador incluye las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse entre los 20°C y los 45°C, y se usa para tener una idea general de la calidad microbiológica del alimento y de las condiciones de manipulación.

No obstante, tiene la limitación de que no puede utilizarse en alimentos sometidos a fermentación, puesto que el alto número de microorganismos obedece únicamente a su proceso productivo (Adams y Moss, 2007).

### 2.1.2.2 Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* engloba 44 géneros y 176 especies de bacterias, y su número continúa creciendo (Garrity *et al.*, 2006). Son bacterias ubicuas e implicadas en el deterioro de alimentos. Algunas de ellas son patógenas para el ser humano, plantas, animales terrestres y marinos (Lindberg *et al.*, 1998).

El uso de las enterobacterias como indicador de calidad microbiológica de los alimentos está aumentando debido a que el uso exclusivo de coliformes y coliformes fecales puede originar una falsa sensación de seguridad, si la mayor parte de la contaminación proviene de microorganismos lactosa negativos. Este grupo de microorganismos incluye a patógenos como *Salmonella*, *Shigella* y algunas cepas enteroinvasivas de *Escherichia coli* como O124 (Adams y Moss, 2007).

Además, la familia *Enterobacteriaceae* incluye géneros de origen no fecal como *Erwinia* y *Serratia*, frecuentemente asociados a plantas, por lo que pueden dar más información sobre la calidad microbiológica del producto (Garrity *et al.*, 2006).

### 2.1.2.3 Coliformes totales

La clasificación de estos microorganismos ha sido controvertida durante décadas. Leclerc *et al.* (2001) propusieron tres categorías: termófilos, que se caracterizan por fermentar lactosa a 44-45°C e incluye al único indicador fiable de contaminación fecal (*Escherichia coli*) y a otros géneros como *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, que pueden provenir de material fecal y otras fuentes ambientales; termófilos y ubicuos, coliformes con varios orígenes ambientales como suelo, agua, vegetación, insectos, etc. (*Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*); y psicrótrofos, que son estrictamente ambientales y capaces de fermentar lactosa a temperaturas de refrigeración y no crecen por encima de 38°C (*Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*).

Los coliformes son bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporogénicos, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a 32-35°C (Davidson *et al.*, 2004).

El hallazgo de recuentos altos de coliformes, como indicador directo o indirecto de contaminación fecal, refleja falta de higiene en la manipulación, almace-

namiento o contaminación posterior al procesado. Además, son indicadores de posible presencia de patógenos entéricos (*E. coli* O157:H7, *K. oxytoca*, *C. freundii*) en agua, productos lácteos, pescados y otros alimentos.

#### 2.1.2.4 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae* que forma parte de la microbiota del tracto digestivo de humanos y animales homeotermos, así como uno de los patógenos más importantes. Fue descrita por primera vez en 1885 por el bacteriólogo alemán Theodore von Escherich y la denominó *Bacterium coli commune*. No fue hasta 1954 cuando recibió su actual denominación, *Escherichia coli*, en honor a su descubridor (Croxen *et al.*, 2013).

Inicialmente, *E. coli* se clasificó mediante identificación serológica en base a los antígenos somático O (lipopolisacárido), F (flagelar) y K (capsular) (Kauffmann y Henig, 1947). Actualmente, se acepta la clasificación basada en los factores de virulencia y síntomas clínicos del hospedador, existiendo al menos siete patotipos (grupo de cepas de la misma especie que causan una enfermedad común) entéricos de *E. coli*: enteropatogénica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), de adherencia difusa (DAEC), enteroinvasiva (EIEC) y de adherencia invasiva (AIEC) y 3 patotipos extraintestinales: uropatogénica (UPEC), asociada a meningitis neonatal (NMEC) y patogénica aviar (APEC) (Allocati *et al.*, 2013).

Para el grupo de EHEC se ha recomendado el uso del término STEC (*Shiga-Toxin E. coli*), porque producen una toxina citotóxica para células vero de similitud estructural a la toxina producida por *Shigella dysenteriae*. Ciertos tipos de *E. coli*, como el O157:H7 pueden producir verotoxinas o Shiga-toxinas causando un cuadro clínico grave. Además de *E. coli* O157:H7 se han identificado otros 6 serotipos productores de STEC: *E. coli* O26, O45, O103, O111, O121 y O145 (Bertoldi *et al.*, 2018).

*E. coli* es un coliforme capaz de crecer tanto en aerobiosis como en anaerobiosis y es inmóvil o móvil gracias a flagelos peritricos. Crece preferiblemente a 37°C y también favorece su proliferación un pH de 7,2 y una  $a_w$  de 0,99. Es oxidasa negativo, fácilmente cultivable en medios selectivos (p. ej. agar MacConkey) donde fermenta la glucosa y la lactosa produciendo un cambio en el pH que es utilizado para diferenciar entre cepas fermentadoras y no fermentadoras de lactosa (Croxen *et al.*, 2013).

La epidemiología de *E. coli* varía dependiendo de las cepas implicadas. La transmisión de STEC es fecal-oral y la dosis infectiva es muy baja. El principal reservorio es el ganado vacuno tanto de carne como lechero y también se ha aislado en otros animales (Gyles, 2007). También se han publicado investigaciones sobre brotes tras exposición ambiental al sobrevivir en el suelo varios meses (Bolton *et al.*, 2011) o en heces de animales de abasto durante varias semanas (Williams *et al.*, 2008).

Los alimentos y agua contaminados también son responsables de brotes alimentarios debidos a STEC. En los Estados Unidos (EE. UU.) se estimó que el 68% de los brotes de O157:H7 y el 82% de los STEC no-O157 estaban relacionados con alimentos (Scallan *et al.*, 2011). La carne se puede contaminar por las heces de animales en el matadero y los vegetales durante el uso de fertilizantes o agua de riego contaminados (Solomon *et al.*, 2002). Los principales alimentos implicados son hamburguesas insuficientemente cocinadas, salchichas, leche sin tratamiento térmico y sus derivados, lechuga, espinacas y coles (Chauret, 2011). La transmisión persona a persona también se ha descrito y adquiere gran relevancia en el caso de manipuladores de alimentos asintomáticos (Stritt *et al.*, 2013). Las infecciones provocadas por STEC fueron la tercera zoonosis más frecuente en la UE en 2018 (EFSA y ECDC, 2019).

En el caso de las cepas EPEC, no hay reservorio ambiental y las infecciones suelen ocurrir vía fecal-oral a través de superficies contaminadas y con menor frecuencia a través de alimentos o agua contaminados (Nataro y Kaper, 1998). Los humanos son los únicos reservorios y la fuente más probable son los niños asintomáticos (Levine y Edelman, 1984). La dosis infectiva es más alta, entre  $10^8$ - $10^{10}$  UFC/g (Levine *et al.*, 1978).

La presentación clínica también varía en función de la cepa causante. Las diarreas en niños son provocadas principalmente por EPEC, EAEC y DAEC y esporádicamente por EIEC. Suele ir acompañada de fiebre, vómitos y deshidratación (Nataro y Kaper, 1998).

La diarrea más grave es la producida por la colitis hemorrágica causada por STEC, que puede derivar en el síndrome urémico hemolítico. En los más pequeños puede causar fracaso renal, anemia hemolítica e incluso pérdida de la función renal, y en los ancianos, además, púrpura trombocitopénica (Bertoldi *et al.*, 2018). En la primavera de 2011, STEC O104:H4 infectó a más de 4000 individuos, principalmente en Alemania, provocando más de 900 casos de síndrome urémico hemolítico (Buchholz *et al.*, 2011).

### **2.1.2.5 Estafilococos coagulasa positivos**

Los estafilococos coagulasa positivos pueden considerarse un indicador de higiene personal y de buenas prácticas de manipulación, aunque también este grupo es considerado un patógeno alimentario. La intoxicación estafilocócica es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más frecuente en todo el mundo, que resulta de la ingestión de la enterotoxina estafilocócica preformada en el alimento por cepas enterotoxigénicas de estafilococos coagulasa positivos, principalmente *Staphylococcus aureus* (Hennekinne *et al.*, 2009; Argaw y Addis, 2015).

En contraposición, los estafilococos coagulasa negativos no suelen ser patógenos y se consideran patógenos oportunistas, como por ejemplo *Staphylococcus epidermidis* causante de infecciones nosocomiales en recién nacidos

(Cheung and Otto, 2010). Ocasionalmente pueden estar implicados en brotes de toxiinfecciones alimentarias (Veras *et al.*, 2008).

*Staphylococcus aureus* debe su nombre al cirujano escocés, Sir Alexander Ogston, quien en 1881 observó una agrupación de cocos con forma de racimo de uvas (*staphyle*: racimo de uvas en griego) en cultivos. En 1884, Rosenbach aceptó, desde un punto de vista taxonómico, el nombre asignado por Ogston y realizó la primera descripción del género *Staphylococcus* (Bergdoll y Lee Wong, 2006; Todar, 2008). En 1914, Barber asoció la intoxicación estafilocócica a una toxina producida por *Staphylococcus* al relacionar los síntomas provocados por el consumo de leche no refrigerada de una vaca con mastitis con el crecimiento en la leche de *Staphylococcus* que fueron aislados también en la mastitis (Crabtree y Litterer, 1934).

*Staphylococcus* spp. pertenece a la familia *Micrococcaceae*. La primera clasificación la estableció Baird-Parker en base a pruebas fisiológicas y bioquímicas, centradas principalmente en la habilidad de producir coagulasa, fermentar manitol (aeróbica y anaeróbicamente), producir endonucleasas estables térmicamente y por la composición de la pared celular (Baird-Parker, 1974).

A esa clasificación le sucedió la realizada por Kloos y Schleifer (1975), aumentando las especies hasta 32 en 1994 (Holt *et al.*, 1994). En la actualidad existen más de 50 especies y subespecies de *Staphylococcus*, de los que 7 son estafilococos coagulasa positivos: *S. aureus* ssp. *aureus*, *S. aureus* ssp. *anaerobius*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans* y *S. lutrae* (Hennekinne *et al.*, 2012).

Desde la primera clasificación de las enterotoxinas de estafilococos por Bergdoll *et al.* (1959), se han descrito 22 enterotoxinas diferentes. Las enterotoxinas SE-A, B, C, D y E son las que más frecuentemente se asocian a intoxicaciones estafilocócicas (Hennekinne *et al.*, 2012).

*S. aureus* es un coco Gram positivo no móvil, anaerobio facultativo, coagulasa positivo, catalasa positivo y oxidasa positivo. En cuanto a su temperatura de crecimiento se considera un mesófilo con un rango que oscila de 7°C a 48°C (tª óptima: 30-37°C). El rango de pH abarca desde 4,2 a 9,3 (pH óptimo: 7,0-7,5). Este microorganismo sobrevive a la desecación, tolerando altas concentraciones de sal (>15% NaCl) y una a<sub>w</sub> de 0,8 (Argaw y Addis, 2015).

A pesar de no producir esporas y ser un microorganismo termosensible, su patogenicidad reside en su ubicuidad, resistencia a los antibióticos y la producción de una toxina altamente termorresistente (100°C/30 minutos) y resistente a las enzimas del tracto digestivo (Le Loir *et al.*, 2003).

Los principales reservorios son los animales y los humanos. Está presente en las fosas nasales y garganta, pelo y en la piel de la mitad de los individuos sanos. También se puede encontrar en el aire, polvo, agua y desechos animales y humanos (Bergdoll y Lee Wong, 2006). El principal vehículo de

transmisión son los manipuladores de alimentos, aunque las superficies y equipos contaminados también son fuentes de contaminación (Bennet y Monday, 2003).

Cualquier alimento es un buen medio de crecimiento para *S. aureus*. Los alimentos más comúnmente implicados en brotes alimentarios son carne y productos cárnicos, huevos, ensaladas de atún, pollo, huevo, patata y macarrones, productos de repostería, y leche y productos lácteos (Bennet y Monday, 2003; Bergdoll y Lee Wong, 2006).

La intoxicación estafilocócica sucede cuando se ingieren enterotoxinas producidas en alimentos mantenidos a una temperatura inadecuada (entre 7,2°C y 60°C). Los síntomas aparecen rápidamente (2-6 horas), produciendo náuseas, vómitos, dolor abdominal y postración. La recuperación tiene lugar normalmente a las 48 horas. Pueden darse casos más severos, si bien la muerte rara vez ocurre en las poblaciones de riesgo (ancianos, inmunocomprometidos lactantes y niños de corta edad) (Bennet y Monday, 2003).

En 2005, los EE. MM. informaron por primera vez a la EFSA de brotes por enterotoxina estafilocócica, con un total de 36 brotes causados por este agente. En el informe de la EFSA y ECDC, de las casi 4000 muestras analizadas por países europeos en 2018, se observó una prevalencia de enterotoxina estafilocócica del 1,2%. De las 46 muestras positivas, 24 correspondieron a leche y derivados lácteos, y las otras 22 a diversos alimentos (ensaladas LPC, sándwiches y otros platos preparados a base de pasta, vegetales, patata y carne) (EFSA y ECDC, 2019).

### **2.1.3 Métodos de detección y cuantificación de microorganismos**

Los análisis microbiológicos son una herramienta esencial para garantizar la seguridad alimentaria en la cadena alimentaria. Tanto las autoridades de control oficial como los operadores de la industria alimentaria realizan análisis microbiológicos para evaluar el cumplimiento de los criterios microbiológicos definidos legalmente y para verificar la eficacia de los sistemas de autocontrol (Jasson *et al.*, 2010).

#### **2.1.3.1 Métodos de referencia**

Los métodos estandarizados, por ejemplo las normas de la Organización Internacional de Normalización (ISO, *International Organization for Standardization*), son considerados los métodos analíticos de referencia para el control oficial de los criterios microbiológicos establecidos en el Reglamento (CE) n.º 2073/2005. La mayoría de estos métodos armonizados y consensuados por expertos y organismos internacionales, se basan en la microbiología tradicional o clásica consistente en la utilización de medios de cultivo (caldos nutritivos o medios sólidos de agar) selectivos para el crecimiento, aislamiento o recuento del microorganismo diana, a la vez que inhiben el crecimiento de la biota no diana (Jasson *et al.*, 2010; Rohde *et al.*, 2017).

El método convencional utilizado para la detección (presencia/ausencia) de microorganismos patógenos se suele dividir en cuatro fases (Boer y Beumer, 1999):

- Preenriquecimiento: incubación durante unas horas en un medio no selectivo para permitir la revivificación y un crecimiento limitado ( $10^2$ - $10^4$  UFC/ml) del microorganismo diana.
- Enriquecimiento: incubación en medio selectivo para suprimir el crecimiento de la biota competitiva y favorecer la multiplicación del organismo diana a concentraciones altas ( $10^4$ - $10^6$  UFC/ml).
- Aislamiento: incubación en un medio de agar selectivo y diferencial.
- Confirmación: a través de un número definido de pruebas morfológicas (color, pigmentación, etc.), fisiológicas, bioquímicas (p. ej. catalasa, indol, coagulasa, etc.) y serológicas (aglutinación).

Los métodos de recuento de colonias en placa son los métodos convencionales por excelencia para el recuento de bacterias en alimentos. En este tipo de métodos el número total de bacterias de un producto alimentario se determina realizando varias diluciones seriadas de la muestra, que se siembran en un medio sólido de crecimiento. El recuento se realiza después de la incubación a una temperatura y condiciones atmosféricas (aerobiosis, anaerobiosis o microaerobiosis) determinadas para el microorganismo diana que será visible a simple vista (Jasson *et al.*, 2010).

Cuando se esperan recuentos bajos ( $<50$  UFC/g), se puede estimar el número de microorganismos de un alimento a través del método del número más probable (NMP) descrito por McCrady en 1915. Se preparan al menos tres diluciones consecutivas y se transfieren a 9 ó 15 tubos con el medio líquido apropiado para el crecimiento del microorganismo estudiado según se emplee el método de tres o cinco tubos, respectivamente. Tras la incubación a una temperatura y tiempo establecidos, se cuenta el número de tubos positivos (atributo específico de la población en el medio de crecimiento) y negativos para cada dilución. Finalmente, al calcular la probabilidad de que los tubos no hayan recibido ninguna célula, se puede estimar el NMP de microorganismos de la muestra inicial con la ayuda de una tabla estadística (Jasson *et al.*, 2010).

Los métodos de microbiología tradicional están ampliamente aceptados al estar amparados por estudios colaborativos de laboratorios independientes. Se conoce la composición de sus medios de cultivo, las técnicas están descritas detalladamente y los materiales se pueden adquirir a través de múltiples proveedores. Además, la infraestructura no es costosa y el material fungible es relativamente barato (Jasson *et al.*, 2010).

La normativa alimentaria vigente en la UE (Reglamento (CE) n.º 2073/2005, modificado por el Reglamento (CE) n.º 1441/2007) establece métodos analíticos de microbiología tradicional como métodos de referencia para el análisis de microorganismos en productos alimenticios (Tabla 2).

**Tabla 2.** Métodos de referencia de los criterios de seguridad alimentaria y criterios de higiene del proceso.

Criterios microbiológicos	
Microorganismo/sus toxinas, metabolitos	Método analítico de referencia <sup>1</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	EN/ISO 11290-1 o 2 <sup>2</sup>
<i>Salmonella</i> spp.	EN/ISO 6579
<i>Cronobacter sakazakii</i>	ISO/DTS 22964
<i>Escherichia coli</i>	ISO TS 16649-1, 2 o 3
Enterotoxinas estafilocócicas	Método europeo de detección del LCR para la leche <sup>3</sup>
Recuento de colonias aerobias	ISO 4833
Enterobacterias	ISO 21528-2
Estafilococos coagulasa positivos	EN/ISO 6888-1 o 2
Presunto <i>Bacillus cereus</i>	EN/ISO 7932 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Se utilizará la última versión de la norma.

<sup>2</sup> Sobre una placa Petri de 140 mm de diámetro o tres placas Petri de 90 mm de diámetro se siembra 1 ml de inóculo.

<sup>3</sup> Hennekinne *et al.* (2003).

Fuente: Reglamento (CE) n.º 2073/2005, modificado por el Reglamento (CE) n.º 1441/2007.

### 2.1.3.2 Métodos alternativos

A pesar de que los métodos de cultivo clásicos son el “*gold standard*”, presentan limitaciones como su laboriosidad y lentitud que pueden retrasar la obtención de resultados. Su elección puede estar inducida por falta de recursos para otras alternativas, de personal capacitado y de infraestructuras adecuadas (Mandal *et al.*, 2011; Law *et al.*, 2014).

La industria alimentaria y las autoridades sanitarias demandan métodos alternativos que proporcionen resultados comparables y rápidos (Jasson *et al.*, 2010; Wiedmann *et al.*, 2014). En este sentido, se han desarrollado métodos alternativos, también conocidos como “métodos rápidos”, al reducir el tiempo en obtener el resultado de un análisis microbiológico. Permiten también el análisis múltiple de muestras y la posibilidad de automatizar el trabajo en el laboratorio (Fung, 1994; Feng, 1996).

Los métodos alternativos están basados principalmente en el cultivo, en la inmunología o en la biología molecular. Otras técnicas disponibles son los *microarrays* (Kostrzynska y Bachand, 2006), la espectrometría de masas (Sandrin *et al.*, 2013) y los biosensores (Duffy y Moore, 2017) para la detección de microorganismos, incluso para la identificación, caracterización y genotipado de las bacterias aisladas. Estos métodos alternativos, sean patentados o validados internamente por un laboratorio, también son aceptados para el análisis oficial si aseguran la sensibilidad y veracidad de los resultados a través de un estudio de validación (Jasson *et al.*, 2010).

### 2.1.3.2.1 Métodos alternativos para el recuento de microorganismos

#### 2.1.3.2.1.1 Automatización

La automatización de los métodos de recuento puede ser muy útil para reducir el tiempo empleado en un ensayo analítico, ya sea en la preparación de medios, de diluciones seriadas, recuento de colonias, etc. La eficiencia y número de muestras procesadas se puede mejorar con máquinas para la preparación de agar, diluidores gravimétricos, contadores de colonias automáticos, etc. (Glynn *et al.*, 2006).

#### 2.1.3.2.1.2 Medios de aislamiento cromogénicos y fluorogénicos

El reconocimiento de colonias presuntivas se ha facilitado con la introducción de medios cromogénicos y fluorogénicos. Estos medios contienen sustratos de enzima ligados a un cromógeno (reacción colorimétrica), fluorógeno (reacción fluorescente) o una combinación de ambos. La población diana se caracteriza por una actividad enzimática que metaboliza el sustrato (azúcares o aminoácidos) y produce un cambio de color en el medio o de fluorescencia bajo luz ultravioleta (Manafi, 1996).

La incorporación de estos sustratos enzimáticos en un medio selectivo puede eliminar la necesidad de realizar más fases de cultivos o pruebas bioquímicas para identificar a un microorganismo (Greenwood *et al.*, 2005; Schonenbrucher *et al.*, 2008).

Diferentes casas comerciales comercializan medios cromogénicos y/o fluorogénicos validados y algunos medios cromogénicos, como por ejemplo ALOA (*Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti*) y TBX (*Tryptone-bile-X-glucuronide*), están incluidos en métodos de referencia (ISO 11290 e ISO 16649, respectivamente).

#### 2.1.3.2.1.3 Medios de cultivo modificados

Algunos de los métodos de cultivo modificados están basados en métodos de recuento de colonias en placa (p. ej. 3M™ Petrifilm™, Compact Dry®), mientras que otros se basan en el principio del método NMP (p. ej. TEMPO®, SimPlate®):

##### 3MTM PetrifilmTM (3MTM)

3M™ Petrifilm™ es un sistema de placas listo para usar con una composición específica para cada placa dependiendo del microorganismo sembrado. El medio de cultivo está depositado en un *film* de plástico en lugar de en una placa de Petri, lo que aporta un ahorro de espacio en el almacenamiento y durante la incubación en la estufa. Tras la incubación a la temperatura y tiempo requeridos por el microorganismo, las colonias típicas se cuentan manual o automáticamente (Ginn *et al.*, 1986)

### Compact Dry® (Nissui Pharmaceutical Co., LTD)

Compact Dry® son unas placas de plástico miniaturizadas que contienen nutrientes deshidratados y componentes diferenciales fáciles de usar. Al igual que las placas 3M™ Petrifilm™, son delgadas, ligeras y fáciles de usar. El principio se basa en sustratos cromogénicos específicos e indicadores redox que tras la incubación se descomponen en productos coloreados por el metabolismo de los microorganismos y facilitan su interpretación (Ellis y Meldrum, 2002).

### SimPlate® (BioControl Systems)

El método SimPlate®, para la estimación del NMP de microorganismos en alimentos y agua, está basado en la tecnología múltiple enzimática (MET™, Multiple Enzyme Technology™) de Laboratorios IDEXX.

La placa tiene 84 pocillos que se rellenan con un medio de cultivo líquido que contiene sustratos enzimáticos únicos para cada enzima bacteriana diferente. La interacción de las enzimas bacterianas con el sustrato provoca una señal (fluorescencia con luz ultravioleta de 365 nm). Después de la incubación, el número de pocillos que emiten fluorescencia se convierte en un NMP utilizando la tabla incluida con el producto. Las reacciones bioquímicas requieren un número más bajo de microorganismos para producir el cambio de color que las placas de agar y la gran cantidad de pocillos proporciona niveles de confianza del 95% de precisión. El rango de recuento va de menos de 1 a 738 UFC por placa, es decir, más del doble de una placa de siembra por vertido estándar (Beuchat *et al.*, 1998; Townsend y Naqui, 1998).

### TEMPO® (bioMérieux)

El sistema TEMPO® es una técnica automatizada del método de recuento del NMP, que consiste en un vial con el medio de cultivo y una tarjeta específicos para el parámetro que se quiere evaluar. Para la ejecución de la técnica es necesario un equipo específico y un *software* exclusivo para la preparación y lectura de las tarjetas.

El ensayo comienza con la hidratación del medio de cultivo liofilizado y la suspensión de la muestra diluida a analizar. La estación TEMPO® Filler transfiere el medio inoculado a la tarjeta, que está compuesta por 3 filas de 16 pocillos con una unidad logarítmica de diferencia, en lugar de los tres o cinco tubos clásicos, lo que lo convierte en un método de cuantificación más preciso que el método NMP tradicional. Una vez selladas las tarjetas en la estación TEMPO® Filler se incuban a la temperatura y tiempo requeridos por cada microorganismo. El microorganismo diana se multiplica en el medio de cultivo y los metabolitos producidos durante el crecimiento generan una señal de fluorescencia (pocillos positivos), que es interpretada estadísticamente con el método del NMP por la estación TEMPO® Reader. El rango de recuento es de 10 a  $4,9 \times 10^4$  UFC/ml o de 100 a  $4,9 \times 10^5$  UFC/ml dependiendo del microorganismo (Paulsen *et al.*, 2006; Kunicka, 2007; Paulsen *et al.*, 2008).

#### 2.1.3.2.1.4 Recuento basado en métodos bioquímicos

##### Impedanciometría

Este método se basa en la medida de la impedancia o resistencia al flujo de una corriente alterna. La bacteria que está creciendo activamente en un medio de cultivo produce productos finales con carga positiva o negativa que causan variaciones de impedancia en el medio. Estos cambios de conductividad eléctrica son proporcionales a la actividad metabólica y, por tanto, al crecimiento bacteriano (Yang y Bashir, 2008; Labrador *et al.*, 2018a, 2018b).

##### Bioluminiscencia ATP

Esta técnica mide la emisión de luz producida por la reacción enzimática entre la luciferasa y sus dos sustratos, luciferina y ATP microbiano. La luz generada (medida en URL, unidades relativas de luz) es proporcional a la concentración de ATP de la muestra, lo que permite hacer una estimación del número de microorganismos en la muestra original. Las curvas de calibración se deben establecer para cada tipo de alimento o superficie y correlacionan la medida de ATP con el recuento microbiano, para concentraciones bacterianas mayores de  $10^4$  UFC/g.

La bioluminiscencia ATP se emplea principalmente para estimar la higiene de las superficies como un rápido indicador de la carga microbiana y otros restos orgánicos (Fukuda *et al.*, 2005; Chen y Godwin, 2006).

#### 2.1.3.2.1.5 Recuento basado en métodos microscópicos

##### Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico cuantitativo que detecta las características físicas y químicas de las células al pasar por un haz de luz. La intensidad de la señal óptica de fluorescencia generada se correlaciona con parámetros celulares estructurales y funcionales. Con la ayuda de pigmentos fluorescentes (p. ej. SYTO 9) se puede evaluar la viabilidad celular a través de diferentes propiedades celulares (actividad metabólica, integridad de la membrana, biosíntesis de macromoléculas, etc.) (Jasson *et al.*, 2010).

Esta técnica tiene aplicabilidad principalmente en sustancias líquidas y es muy utilizada en la industria láctea, para la cual se desarrolló el método Bactoscan 8000 (Gunasekera *et al.*, 2003).

##### Microscopía de epifluorescencia directa sobre filtro (DEFT, *Direct Epifluorescent Filter Technique*)

Esta técnica se basa en filtrar una muestra pretratada (detergentes y enzimas proteolíticas) a través de una membrana de policarbonato. Las bacterias que se recogen y concentran sobre la membrana son teñidas con un colorante fluorescente y se cuentan con un microscopio con una fuente de luz incidente (epifluorescencia). La DEFT se automatiza conectando el microscopio a un computador analizador de imágenes (Pettipher *et al.*, 1992).

#### 2.1.3.2.1.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) en tiempo real

La base de todos los métodos moleculares es la amplificación de una o varias copias de una secuencia específica de ADN, gracias a la acción de la enzima ADN polimerasa y la repetición de un ciclo térmico de tres etapas: desnaturalización del ADN molde, hibridación de los cebadores y elongación. Estas fases se repiten  $n$  número de veces o ciclos (entre 20 y 40 veces), amplificándose el ADN de una manera exponencial.

En la técnica de PCR en tiempo real, la amplificación tiene lugar en el interior de un termociclador, donde se realiza la medición del incremento de la intensidad de una señal fluorescente en tiempo real (Rijpens y Herman, 2002). El sistema de detección de fluorescencia puede ser un agente intercalante (p. ej. SYBR) o sondas de fluorescencia. Las sondas de hidrólisis (TaqMan®), que emiten la señal de fluorescencia al final de la etapa de elongación, son las sondas de fluorescencia más utilizadas en la PCR en tiempo real (Popping *et al.*, 2010).

Para cuantificar microorganismos mediante esta técnica se debe realizar una curva de calibración estándar de ADN. Esto se consigue con diluciones seriadas de ADN diana de concentración conocida que se analizan mediante PCR en tiempo real y permite correlacionar los valores de los ciclos de cuantificación ( $C_t$ , *cycle threshold*) con las copias de ADN de los extractos. En el análisis de una muestra, el  $C_t$  es inversamente proporcional a la cantidad inicial de ADN diana presente en la muestra (Popping, *et al.*, 2010).

Se han publicado estudios de cuantificación mediante PCR en tiempo real de *L. monocytogenes* en carne (Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2006; Rantsiou *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2015), de *S. aureus* (Alarcón *et al.*, 2006) y de *Campylobacter* spp. (Botteldoorn *et al.*, 2008). Sin embargo, el límite de cuantificación se sitúa entre  $10^3$  y  $10^4$  UFC/g, superior a lo establecido por la legislación para algunos patógenos (p. ej. *L. monocytogenes*  $<100$  UFC/g). Además, hay que tener en cuenta que la PCR en tiempo real cuantifica copias de ADN y, por tanto, es necesario establecer la relación entre copias genómicas y el número de UFC/g.

Para conseguir reducir el límite de cuantificación se debería aplicar la técnica directamente en el alimento o concentrar los microorganismos presentes en el mismo, pero analizar la muestra sin una dilución previa puede inhibir la reacción de amplificación. Por ello, la fase de preparación de la muestra para eliminar los posibles inhibidores o ADN de biota competitiva es clave, pero el paso de preenriquecimiento está totalmente desaconsejado. Para recuperar las células del alimento y obtener un ADN altamente purificado se han desarrollado pasos intermedios como la centrifugación o utilización de membranas de filtración o tampones específicos de lisis que aseguran la eficiencia de la reacción (Mester *et al.*, 2014).

## 2.1.3.2.2 Métodos alternativos para la detección de microorganismos patógenos

### 2.1.3.2.2.1 Medios de cultivo modificados

El tiempo de ejecución de los métodos convencionales se puede reducir con ligeras modificaciones en la metodología. Por ejemplo, se comercializan diferentes caldos de enriquecimiento en un solo paso que permiten la revitalización de las células dañadas y el crecimiento hasta un número detectable (Jasson *et al.*, 2009).

En la fase de confirmación también se han introducido kits de identificación que reemplazan los complejos pasos de la confirmación clásica. Se basan en galerías miniaturizadas de tubos o pocillos con reactivos deshidratados (p. ej., API®) a los que se inocula una suspensión de la presunta colonia típica. Para esta última fase también se puede realizar una confirmación serológica mediante aglutinación en látex (Van Griethuysen, *et al.*, 2001).

### 2.1.3.2.2.2 Inmunoensayos

La técnica de inmunoensayo se basa en la unión específica anticuerpo-antígeno, obteniendo un mejor rendimiento cuanto más apropiada sea la selección del anticuerpo, monoclonal o policlonal. En cualquier caso, un resultado positivo en la detección de un patógeno mediante inmunoensayo se considera sospechoso y requiere pruebas de confirmación. El límite de detección es de  $10^4$ - $10^5$  UFC/g o ml (Jasson *et al.*, 2010).

A continuación, se describen diferentes tipos de inmunoensayos para la investigación de patógenos.

#### Tiras de flujo lateral (LFD, *Lateral Flow Devices*)

Las LFD son membranas de nitrocelulosa porosa con una proteína inmovilizada, normalmente un anticuerpo, marcado con nanopartículas de oro o partículas de látex coloreadas. Si hay unión entre el anticuerpo marcado y el analito diana presente en la muestra se forma una banda visible. Existe una segunda membrana con anticuerpos específicos que se unen al anticuerpo marcado con oro coloidal a modo de control interno del test. Es un test rápido y simple que cuenta con diferentes formatos validados (principalmente tipo sándwich) en el mercado (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009).

#### Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

El ELISA es una técnica bioquímica que combina un inmunoensayo con un ensayo enzimático. El ELISA sándwich es el método alternativo de enzimo-inmunoensayo más usado. En un primer paso, se añade la muestra con la posible presencia del antígeno diana en una placa de multipocillos que en su superficie tiene fijados los anticuerpos. El siguiente paso es un lavado mediante el cual los antígenos que no se han unido son retirados. A continuación, se

adiciona un segundo anticuerpo conjugado con una enzima que se unirá al complejo anticuerpo-antígeno formado anteriormente. Se realiza otro lavado para eliminar los anticuerpos secundarios no ligados. Finalmente, se añade un sustrato cromogénico que es convertido por la enzima en una señal detectable (Thacker *et al.*, 1996).

La técnica ELISA, por sí sola, se lleva a cabo en 2-3 horas y además hay disponibles robots automatizados que ayudan a reducir el tiempo; a aumentar el número de muestras procesadas; y a mejorar la reproducibilidad y la estandarización del método.

#### Ensayo por Fluorescencia Ligado a Enzima (ELFA, *Enzyme-Linked Fluorescent Assay*)

La metodología ELFA es un ELISA sándwich con lectura final en fluorescencia, proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Tiene una alta sensibilidad y especificidad.

El sistema VIDAS® (bioMérieux) está basado en la técnica ELFA y es un sistema automático de inmunodetección rápida de patógenos, de alta sensibilidad y especificidad. Los anticuerpos están fijados en la fase sólida de la reacción que consiste en un cono que actúa como pipeta. Los reactivos están en el mismo cartucho en el que se deposita la muestra. El equipo realiza el análisis automáticamente en una hora, aproximadamente (Curiale *et al.*, 1997; Sewell *et al.*, 2003).

#### Separación inmunomagnética (IMS, *Immunomagnetic separation*)

La IMS no se puede considerar un método de detección, sino más bien una técnica utilizada en la preparación de la muestra. Su uso reduce el tiempo empleado en la fase de enriquecimiento previa a la detección.

Se basa en la utilización de unas partículas superparamagnéticas cubiertas con anticuerpos que capturan y aíslan los microorganismos diana de la suspensión de la muestra sin necesidad de columnas de inmovilización o centrifugación (Wright *et al.*, 1994). Existen en el mercado partículas superparamagnéticas (p. ej. Dynabeads™) y sistemas de captura inmunomagnética automatizados de recirculación de alto volumen para mejorar la sensibilidad y la eficiencia (Pathatrix™).

La IMS está incluida en la Norma ISO 16654:2002/A1:2017 para la detección de *E. coli* O157:H7 en alimentos. En los métodos de detección de *Salmonella* spp. se utiliza para sustituir el paso de enriquecimiento selectivo y reducir 24 horas el ensayo.

#### **2.1.3.2.2.3 Métodos basados en bacteriófagos**

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y presentan una gran especificidad por un hospedador, mediada en parte por las proteínas asociadas a la cola del fago que reconocen moléculas de la superficie bacteriana. Estas proteínas del bacteriófago pueden utilizarse para recubrir partículas paramag-

néticas e integrarse en un protocolo de detección rápida de bacterias mejorando la sensibilidad y el porcentaje de recuperación (Kretzer *et al.*, 2007).

Esta tecnología se puede combinar con otro paso donde el bacteriófago lisa la bacteria viable por la que presenta especificidad y en su interior libera la adenilato kinasa. La amplificación de esta enzima media la conversión de ADP a ATP, que se detecta por bioluminiscencia, mejorando la técnica estándar de bioluminiscencia ATP en sensibilidad y en especificidad debido a la propia especificidad del fago y del anticuerpo (Blasco *et al.*, 1998).

#### **2.1.3.2.2.4 Métodos basados en microscopía**

La citometría de flujo puede no ser lo suficientemente sensible para detectar concentraciones inferiores a  $10^3$ - $10^4$  UFC/ml si el inóculo es pequeño. En estas situaciones, una fase previa de enriquecimiento puede ayudar a aumentar la carga bacteriana y así ser detectada (Veal *et al.*, 2000). Alternativamente al uso del citómetro de flujo, con el microscopio de epifluorescencia se pueden visualizar células teñidas y ser empleado dentro del marco de la hibridación fluorescente *in situ*.

#### **2.1.3.2.2.5 Métodos basados en biología molecular**

##### Hibridación fluorescente in situ (FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*)

El objetivo de esta técnica es detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos de bacterias mediante sondas de unos 15 a 25 oligonucleótidos marcados en el extremo 5' con una molécula fluorescente que se hibridan bajo unas condiciones restrictivas. Tras un lavado, las secuencias teñidas son detectadas con un microscopio de epifluorescencia (límite de detección:  $10^4$  UFC/ml) (Bottari *et al.*, 2006).

##### PCR convencional, en tiempo real y multiplex

Los productos de la PCR convencional se detectan por una electroforesis en gel de agarosa teñido con algún agente intercalante (p. ej. bromuro de etidio) o mediante tinción fluorescente, que permite ver el ADN amplificado en bandas de diferentes tamaños. Es una técnica cualitativa, ya que la cantidad de producto final no es proporcional a la cantidad inicial de ADN, debido a la limitación de reactivos y acumulación de sustancias inhibitoras en los ciclos finales. Estas limitaciones se solucionaron con la aparición de la PCR en tiempo real, que permite la detección y cuantificación de la señal fluorescente emitida continuamente durante la reacción.

Hay numerosos kits comerciales de PCR en tiempo real validados, ya que es una herramienta muy útil para el cribado rápido de muestras que, en caso de resultar positivas, se tendrán que confirmar con métodos tradicionales (Malorny *et al.*, 2003).

Además, como respuesta a las limitaciones de los métodos convencionales que se han indicado, la PCR en tiempo real se ha reconocido, en base a

la precisión de los resultados, como método de referencia. Es el caso de la Norma ISO 13136:2012 para la detección de STEC tanto *E. coli* O157 como no-O157, y de las Normas ISO 15216-1:2017 e ISO 15216-2:2019 para la determinación cuantitativa y detección, respectivamente, del virus de la hepatitis A y de norovirus en alimentos.

Otra versión útil en la detección de patógenos es la PCR multiplex, mediante la que varios cebadores específicos se combinan en un único ensayo PCR para la detección rápida y múltiple de microorganismos (Settanni y Corsetti, 2007).

#### 2.1.4 Validación de los métodos alternativos

Los métodos alternativos también pueden ser aceptados para el análisis oficial de alimentos si demuestran resultados equivalentes al método convencional a través de un estudio de validación. En el caso de peligros emergentes, para los que todavía no se ha alcanzado un acuerdo internacional, los métodos internos desarrollados por el laboratorio también pueden ser aceptados en el análisis oficial de alimentos, siempre y cuando sean apropiados para el uso previsto y se hayan validado (Jasson *et al.*, 2010).

De hecho, el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 autoriza el uso de métodos analíticos alternativos a condición de que estén validados con respecto al método de referencia conforme al protocolo de la Norma UNE-EN ISO 16140 u otros protocolos aceptados internacionalmente. Además, el uso de métodos validados es también un prerrequisito para los laboratorios acreditados en la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017. Esta Norma define validación de un método como la confirmación a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto (AENOR, 2017).

En Europa, instituciones como la *Association Française de Normalisation* (AFNOR), el *Nordic Committee on Food Analysis* (NordVal) o la *European Validation and Certification Organisation* (MicroVal) se basan en la Norma ISO 16140 para certificar métodos de validación. En los EE. UU. la *Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International* valida los métodos alternativos en base a los métodos de referencia identificados en el *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) de la U. S. *Food and Drug Administration* (FDA) o en la *Microbiology Laboratory Guidebook* (MLG) del *The United States Department of Agriculture* (USDA). AFNOR y AOAC han validado más de 100 métodos, y MicroVal y NordVal alrededor de 20 (Rohde *et al.*, 2017).

La Norma UNE-EN ISO 16140-2:2016 “Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia” especifica el principio general y el protocolo técnico para la validación de métodos alternativos, por lo general patentados, relacionados con la microbiología de la cadena alimentaria. Su objetivo es que los estudios de validación realizados conforme

a esta parte de la Norma ISO 16140 se desarrollen por parte de organizaciones dedicadas a la validación de métodos.

En el contexto de esta Norma ISO, la validación implica un estudio comparativo que busca el grado de correspondencia entre los resultados obtenidos en el método de referencia y la respuesta obtenida en el método alternativo en muestras idénticas. También requiere un estudio interlaboratorial que demuestre la precisión y robustez del método.

Se pueden validar tanto métodos cualitativos como cuantitativos. Para los métodos cualitativos estas características se obtienen de los estudios de sensibilidad, del nivel de detección relativo (al menos tres niveles de contaminación) y de inclusividad y exclusividad. En el caso de los métodos cuantitativos, se basa en estudios de veracidad relativa, de perfil de exactitud, de límite de cuantificación y de inclusividad y exclusividad (AENOR, 2016).

## **2.2 ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA DIETA DESTINADA A LA POBLACIÓN INFANTIL**

### **2.2.1 Importancia de la alimentación saludable**

Para la OMS una dieta saludable ayuda a protegernos de la malnutrición en todas sus formas y de las ENT como la diabetes, las cardiopatías, los accidentes cerebrovasculares y el cáncer (OMS, 2018a). La relación entre los hábitos alimentarios y las ENT se ha investigado ampliamente demostrándose la asociación existente entre factores dietéticos específicos (consumo de frutas, vegetales, carne procesada, grasas *trans*) y las ENT (Micha *et al.*, 2017; WCRF, 2018).

La OMS incluyó, en su Plan de Acción Global para la Prevención y Control de las ENT, estrategias frente a los patrones dietéticos no saludables, además de medidas de otros factores de riesgo como la inactividad física o el consumo de tabaco y bebidas alcohólicas. Los cambios dietéticos propuestos se referían a reducir el balance energético, limitar la ingestión de grasas *trans* y saturadas, sal y azúcar, y aumentar el consumo de frutas y vegetales (OMS, 2013).

Muchas de estas estrategias están incluidas en dietas tradicionales como la mediterránea, nórdica o incluso algunas asiáticas (coreana, china y japonesa), y en dietas basadas en estudios nutricionales como la dieta de enfoques alimentarios para detener la hipertensión (DASH, *Dietary Approaches to Stop Hypertension*) y la dieta de intervención Mediterránea-DASH para el retraso neurodegenerativo (MIND, *Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay*). Estos patrones dietéticos se han revisado recientemente por Cena y Calder (2020), como ejemplo de dietas saludables que reducen el riesgo de ENT y alineadas con el citado Plan de Acción Global para la Prevención y Control de las ENT. En general, estas dietas saludables incluyen alimentos de origen vegetal (frutas y vegetales, cereales de grano entero, legumbres, frutos secos y semillas) y un bajo contenido de alimentos de origen animal,

particularmente carnes procesadas y grasas. A estos patrones dietéticos hay que añadir otros factores que crean un estilo de vida saludable, como una adecuada hidratación con agua o infusiones de hierbas, ejercicio regular, socialización y descanso adecuado, así como evitar otros factores negativos como tabaco, exceso de bebidas alcohólicas y estrés.

Todas estas recomendaciones relativas a un patrón dietético saludable están en consonancia con la última edición de las “Guías Alimentarias para la población española” de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). Esta herramienta educativa promueve una alimentación equilibrada, variada y moderada, que incluya cereales de grano entero, frutas, verduras, legumbres y cantidades variables de lácteos alternándolos con el consumo de pescados, huevos y carnes magras, junto con el uso preferente de aceite de oliva virgen extra como grasa culinaria. Además, recalca como consideraciones básicas la práctica de actividad física, el equilibrio emocional, el balance energético, los procedimientos culinarios saludables y una ingesta adecuada de agua, todo ello representado en la pirámide que se abordará más adelante (Figura 5) (Aranceta-Bartrina, 2019).

A pesar de la aceptación generalizada de los beneficios de unos correctos hábitos alimentarios, una reciente publicación (GBD, 2019) ha dado la voz de alarma con los efectos sobre la salud provocados por una dieta desequilibrada. En este estudio se ha realizado una revisión de los riesgos alimentarios derivados de la dieta consumida en 195 países por adultos mayores de 25 años, entre los años 1990 y 2017. El dato más relevante es que en 2017 las

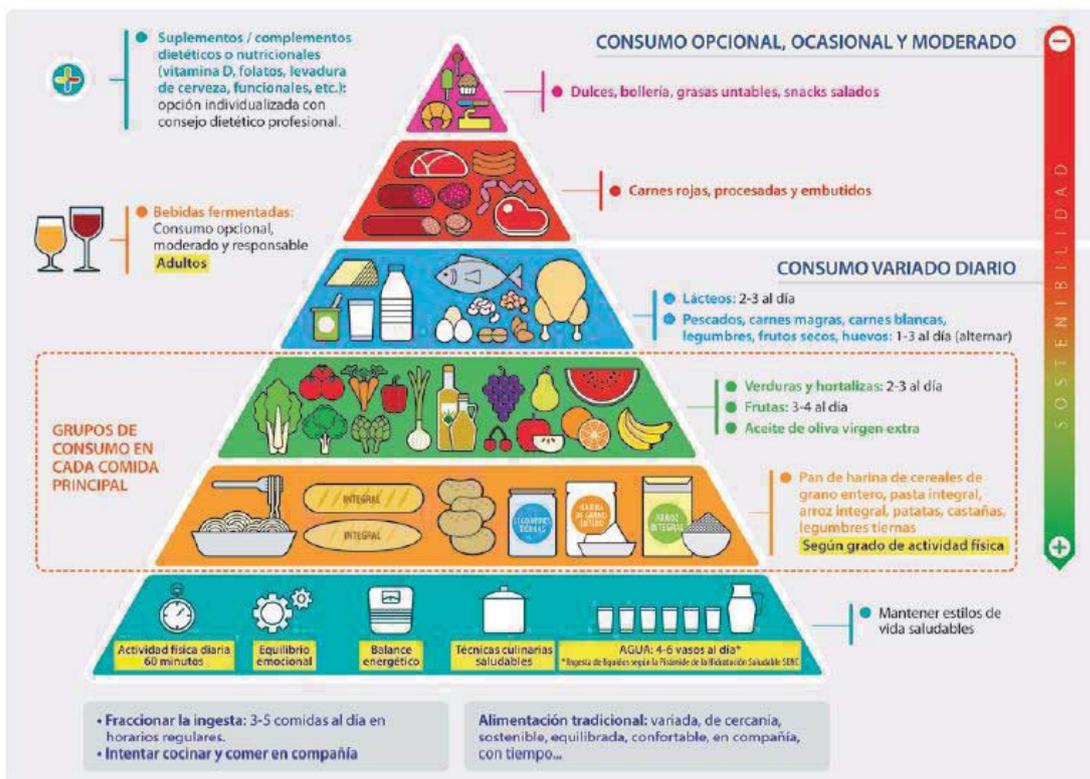


Figura 5. Pirámide de la alimentación saludable (Aranceta-Bartrina, 2019)

enfermedades relacionadas con una dieta desequilibrada fueron la causa de 11 millones de fallecimientos y de 255 millones años de vida ajustados por discapacidad. Globalmente, los resultados muestran un déficit de alimentos saludables y un exceso de alimentos no saludables, como las bebidas azucaradas, carnes procesadas, sodio y carne roja. Los principales factores dietéticos de riesgo fueron el bajo consumo de frutas y cereales de grano entero y la elevada ingesta de sodio, que provocaron el 50% de las muertes y el 66% de los años de vida ajustados por discapacidad atribuibles a la dieta.

### **2.2.2 Relación entre los hábitos alimentarios adquiridos en la infancia y la prevención de la enfermedad en el adulto**

La prevención de los factores de riesgo es fundamental para evitar las ENT y la alimentación a lo largo de toda la vida es clave en ese control. Esa prevención es especialmente relevante en la edad infantil, momento en el que se inculcan unos hábitos que repercutirán a corto plazo, pero también tendrán consecuencias a largo plazo. Los niños con sobrepeso tienden a seguir siendo obesos en la edad adulta y, por tanto, tienen mayor probabilidad de padecer ENT a edades más tempranas (OMS, 2004). Se ha demostrado la asociación entre un índice de masa corporal (IMC) elevado en edad infantil y la probabilidad de sufrir diabetes, enfermedad coronaria y cáncer en edad adulta (Llewellyn *et al.*, 2016; Céline *et al.*, 2019; Bjerregaard *et al.*, 2020).

La actual epidemia de obesidad infantil se ha convertido en una de las principales preocupaciones de la OMS. Según un informe de este organismo internacional, en 2014, 41 millones de niños menores de 5 años presentaban sobrepeso u obesidad en todo el mundo, siendo la principal causa la exposición a entornos obesogénicos, tanto en los países de ingresos altos como en los de ingresos bajos y medios, y en todos los grupos socioeconómicos. En este informe se recogen una serie de recomendaciones que pretenden que los niños en edades tempranas adquieran unas preferencias de alimentación que ayudarán a la prevención de las ENT en la edad adulta y, a su vez, redundarán en importantes beneficios económicos e intergeneracionales (OMS, 2016).

En España, según señala el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (MSCBS) en la última Encuesta Nacional de Salud de la población española (2017), la obesidad en la población infantil y juvenil (2-17 años), se mantiene en cifras elevadas (10,3%), no existiendo diferencias entre niños (10,4%) y niñas (10,2%) en la prevalencia de obesidad. Asimismo, el 18,26% de este grupo de población tiene sobrepeso, sin presentar tampoco diferencias entre sexo. Estas cifras indican que el número de niños obesos en nuestro país ha seguido aumentando ligeramente desde la anterior encuesta realizada en 2011, como consecuencia de unos hábitos alimentarios inadecuados y de una vida sedentaria. En comparación con el resto de países de Europa, en lo que se refiere a la población infantil y obesidad, nuestro país ocupa una posición media o media-alta, solo comparable a las de otros países mediterráneos (MSCBS, 2018).

### 2.2.3 Características fisiológicas: crecimiento y desarrollo

El crecimiento es un proceso fisiológico continuo en el que aumenta el tamaño del cuerpo en su totalidad a un ritmo diferente según las diferentes etapas. Se diferencian tres períodos: período de crecimiento acelerado, durante los primeros años de vida; período de crecimiento estable, en la edad preescolar y escolar; y período de aceleración del crecimiento, propia de la pubertad (Alonso, 2003).

Por desarrollo se entiende la capacidad de diferenciación celular que tienen los diferentes órganos y tejidos y la adquisición de funciones específicas por los mismos. La maduración es el nivel de desarrollo alcanzado en un momento en concreto. El desarrollo en la etapa infantil es trascendental por las implicaciones que tendrá durante toda su vida, particularmente en las áreas social, cognitiva y emocional. Este desarrollo psicosocial tiene lugar normalmente en un contexto familiar y escolar (Alonso, 2003; Lucas y Feucht, 2009).

El crecimiento y desarrollo están condicionados por la interacción entre genética y ambiente. Si el niño presenta una buena salud, con una adecuada nutrición y un entorno favorable, la genética supone alrededor del 80% de los factores que influyen en el crecimiento y desarrollo del individuo (Alonso, 2003; Lucas y Feucht, 2009).

### 2.2.4. Patrones alimentarios durante el período de 1 a 3 años

Al finalizar esta primera etapa, los órganos y sistemas han madurado de manera similar al adulto y las funciones psicomotoras se siguen desarrollando. El niño “aprende a comer” (masticar, tragar, saborear, diferenciar colores, olores y texturas), por lo que es el momento de aprendizaje de buenos hábitos alimentarios que perdurarán en el futuro y el período donde se crean las características del gusto (Cañedo-Argüelles *et al.*, 2019).

#### 2.2.4.1 Formación del gusto alimentario y desarrollo de los hábitos alimentarios

El término de preferencias alimentarias se refiere al gusto por un alimento, más concretamente por un sabor. Los niños nacen con una predisposición biológica hacia el sabor dulce y de rechazo hacia el amargo. La preferencia innata al sabor dulce (azúcares) de alimentos presentes en la naturaleza y presumiblemente seguros, resulta fundamental para asegurar un consumo de glucosa suficiente que cubra las necesidades del cerebro en época de crecimiento y desarrollo. Además, el consumo de frutas por su sabor dulce garantiza la ingesta adecuada de vitaminas y minerales en la infancia. La aversión al sabor amargo se debe al impulso biológico de defensa frente a sustancias tóxicas o venenosas (Bosqued y Royo-Bordonada, 2017; Forestell, 2017).

Estas preferencias y aversiones adaptativas que permitieron a nuestros ancestros seleccionar nutrientes y evitar toxinas, en el ambiente actual obesogénico, son contraproducentes. La hiperestimulación al sabor dulce en la ma-

yoría de los alimentos ultraprocesados, bebidas azucaradas y dulces puede inducir a una ganancia de peso y desplazar la ingesta de otros alimentos más nutritivos. Por otra parte, el rechazo al sabor amargo de las verduras crucíferas puede provocar una carencia de micronutrientes esenciales (Bosqued y Royo-Bordonada, 2017; Forestell, 2017).

Afortunadamente, antes del nacimiento y durante el desarrollo infantil, se puede educar el gusto por los alimentos. La primera experiencia con los sabores la recibe el feto a través de los alimentos que ingiere la madre y se transfieren al líquido amniótico. Durante la lactancia también se transmiten una gran variedad de sabores desde la dieta de la madre a la leche materna. Finalmente, en la etapa de transición a una alimentación adulta, las preferencias también se pueden modular con la exposición repetida (de 8 a 10 veces) a una amplia variedad de alimentos saludables (Forestell, 2017; Cañedo-Argüelles *et al.*, 2019).

Por tanto, el proceso de aprendizaje de las preferencias alimentarias saludables empieza con la promoción y protección de la lactancia materna, la introducción apropiada de la alimentación complementaria, y la progresiva exposición a alimentos de distintos sabores y texturas durante la etapa pre-escolar. La adquisición de los hábitos alimentarios que se adopten en esta etapa persistirán toda la vida y ayudarán a prevenir ENT (Bosqued y Royo-Bordonada, 2017).

Los hábitos alimentarios son en gran medida fruto de un aprendizaje condicionado por los entornos culturales, sociopolíticos y económicos. Tanto el papel de los padres, manteniendo buenos hábitos alimentarios que sirvan como modelo y protección de influencias negativas, como el del comedor escolar con su función de educación nutricional, son fundamentales para el aprendizaje temprano de los hábitos alimentarios.

Otros factores que influyen en la modelización de los hábitos alimentarios son los fomentados por personajes famosos y los ligados a la comercialización del producto (presentación atractiva, regalos asociados, tamaño desproporcionado de las porciones, publicidad, etc.) (Bosqued y Royo-Bordonada, 2017). En este sentido, cabe destacar el Código de correulación de la publicidad de alimentos y bebidas dirigida a menores, para prevención de la obesidad y salud (Código PAOS), de objetivos compartidos con la OMS, promocionado por las autoridades sanitarias españolas y la industria de alimentos y bebidas (AESAN, 2005b, modificado en 2012).

Asimismo, y como estrategia novedosa dentro de la publicidad alimentaria, cabe mencionar el marketing nutricional. Se refiere a cualquier uso de información nutricional o relativa a la salud (declaraciones nutricionales, alegaciones de salud, grafismos sugerentes de producto saludable y avales sanitarios o científicos), más allá de los mínimos exigidos por la normativa del etiquetado nutricional, atribuyendo al producto determinados beneficios, cuya veracidad no siempre está debidamente contrastada (Cuevas-Casado, 2012).

Aunque las preferencias (innatas o adquiridas) son persistentes y resistentes al cambio, pueden modificarse mediante estrategias de intervención bien dirigidas. Para modificar las conductas alimentarias poco saludables, es esencial un profundo conocimiento de los rasgos psicológicos del comportamiento humano considerando todos los factores externos e internos que condicionan las elecciones alimentarias (Bosqued y Royo-Bordonada, 2017).

### 2.2.5 Necesidades nutricionales

Durante la etapa preescolar y escolar, los requerimientos nutricionales deben evitar los posibles excesos o déficits planteados por las necesidades metabólicas basales, por el aumento del ritmo de crecimiento y por la actividad física. Los niños requieren una alimentación variada que asegure la cantidad suficiente de energía, proteínas, hidratos de carbono, grasas, vitaminas y minerales para el crecimiento y desarrollo óptimos. Las principales funciones de los nutrientes son la energética, la plástica y la reguladora (Requejo y Ortega, 2015).

Las ingestas recomendadas (IR) son los niveles de ingesta de energía y nutrientes esenciales que, en base a conocimientos científicos, se consideran adecuados para satisfacer las necesidades nutricionales de la mayoría de la población sana con actividad física moderada. Las IR se establecen por grupos de sexo y edad bajo la distribución de frecuencia de los requerimientos nutricionales individuales del 97,5% de la población, calculadas a partir de dos desviaciones estándar a la cantidad del requerimiento medio estimado, que define el nivel de ingesta que debe cubrir las necesidades del 50% de los individuos (Alonso y Castellano, 2007; Vázquez, 2017).

Cuando las evidencias científicas no son suficientes para establecer una IR, se utiliza la ingesta adecuada (IA), que estima una cantidad suficiente para cubrir las necesidades de la población sana en base al conocimiento disponible (Vázquez, 2017).

Las IR americanas (RDA, *Recommended Dietary Allowances*) son las más conocidas y utilizadas internacionalmente, establecidas por primera vez en 1941 por el Comité de Nutrición (FNB, *Food and Nutrition Board*) de la Academia Americana de Medicina. En las últimas publicaciones del FNB (1998-2002) se actualizaron las recomendaciones y se cambió la terminología. En general, se habla de ingestas dietéticas de referencia (DRI, *Dietary Reference Intake*), distinguiendo entre RDA (con base científica) o IA (estimaciones). También se define el nivel superior de ingesta tolerable (UL, *Upper Intake Level*), como la cantidad máxima de un nutriente a partir de la cual pueden existir riesgos para la salud. Para niños de edad corta la mayoría de las recomendaciones se basan en extrapolaciones de valores de adultos y pertenecen a la categoría de IA (Alonso y Castellano, 2007).

En España, la Federación Española de Sociedades Científicas de Alimentación y Nutrición (FESNAD), propuso en 2010 DRI para la población española (Cuervo *et al.*, 2010).

### 2.2.5.1 Tablas y bases de datos de composición de alimentos

La manera práctica de utilizar las recomendaciones de ingesta de nutrientes es en función de los alimentos que los contienen, para lo que se emplean las tablas de composición de alimentos (TCA). Las TCA y las bases de datos de composición de alimentos (BDCA) proporcionan información sobre los componentes de los alimentos para estimar la ingesta de nutrientes. En España se utilizan de manera habitual en el ámbito académico, científico y profesional las TCA/BDCA elaboradas en las décadas de 1990 y 2000 por universidades, centros de investigación y laboratorios (Lupiañez-Barbero *et al.*, 2018). En la Tabla 3 se recogen las TCA españolas elaboradas en esos años.

Sin embargo, España carecía de una BDCA oficial que unificara las diferentes TCA españolas y siguiera las recomendaciones del *European Food Information Resource* (Eurofir AISBL). Por ello, en 2004 la AESAN creó un grupo de trabajo (red BEDCA) y, en 2010, apareció la primera base de datos española de composición de alimentos (BEDCA) de acceso libre y gratuito, cuya última versión cuenta con un total de 950 alimentos, 34 componentes y 13 grupos de alimentos (AESAN, 2010a).

**Tabla 3.** Tablas y bases de datos de composición de alimentos publicados en España (1990-2010).

Título	Referencia
Tablas de composición de alimentos	Moreiras <i>et al.</i> (1992)
Tabla de composición de alimentos españoles	Mataix-Verdú <i>et al.</i> (1993)
Tabla de composición de alimentos españoles	Requejo <i>et al.</i> (1995)
Tabla de composición de alimentos	Martin (1997)
Tablas de composición para platos cocinados	Bello <i>et al.</i> (1998)
Tablas de composición de los alimentos del CESNID	Farran <i>et al.</i> (2003)
La composición de los alimentos	Ortega <i>et al.</i> (2004)
Base de Datos Española de Composición de Alimentos	AESAN (2010)

Fuente: Elaboración propia adaptada de Lupiañez-Barbero *et al.* (2018).

Para el análisis y evaluación de dietas se utilizan programas informáticos nutricionales que contienen datos nutricionales provenientes de las TCA/BDCA. En la Tabla 4 se detallan los programas informáticos nutricionales junto con sus TCA/BDCA correspondientes. Además, algunos grupos de investigación y compañías farmacéuticas han desarrollado programas nutricionales (DIET-SOURCE®, PNUTRI®, DIETSTAT®) y algunas sociedades científicas ofrecen calculadoras de dietas gratuitas basadas en datos de programas nutricionales o de TCA (Lupiañez-Barbero *et al.*, 2018).

**Tabla 4.** Principales programas nutricionales españoles y origen de sus datos.

Programa nutricional	Origen de los datos
ALIMENTADOR.ES	BDCA/TCA europeas y americanas y etiquetado nutricional de los alimentos
DIAL®	BDCA/TCA europeas y americanas, TCA de Ortega <i>et al.</i> (2004)
EASYDIET®	TCA de Farran <i>et al.</i> (2003)
I-DIET®	TCA de Martín Peña (1997)
NUTRIBER®	TCA de Mataix-Verdú <i>et al.</i> (2003)
NUTRISALUD-ALIMENTACIÓN Y SALUD®	TCA de Mataix-Verdú <i>et al.</i> (1993)
NUTRISOL®	TCA de Moreiras Varela <i>et al.</i> (1996)
VD-FEN®	TCA de Moreiras Varela <i>et al.</i> (1992)
PCN Pro v.1.0®	TCA de Farran <i>et al.</i> (2003)
DIET CREATOR®	BDCA/TCA europeas y americanas, TCA de Farran <i>et al.</i> (2003)
DIETPRO.COM®	BDCA/TCA europeas y americanas
EVALFINUT®	BEDCA (2010), BDCA americana USDA (2014)
SATN2014®	BDCA americana USDA (1998), Requejo y Ortega (1999)
DIETWIN 8.0®	BDCA americana USDA (2014)

Fuente: Elaboración propia adaptada de Lupiañez-Barbero *et al.* (2018).

### 2.2.5.2 Guías alimentarias o dietéticas

Son herramientas didácticas que traducen las recomendaciones cuantitativas de nutrientes a alimentos, comidas y hábitos alimentarios. En la actualidad 90 países utilizan guías alimentarias, la primera de las cuales se publicó en Suecia en 1974, incluyendo como imagen representativa una pirámide. Todas ellas tienen un mensaje común: consumo de una variedad de alimentos (incluidas grandes cantidades de frutas y verduras, y agua como la bebida de elección), y la limitación de la ingesta de azúcar, grasas y sal. No obstante, hay variaciones según zonas geográficas y culturas. Así, por ejemplo, en países de Oriente Medio destacan el consumo de legumbres (garbanzos, lentejas) o en países del área mediterránea (Croacia, Chipre, Grecia y España) priorizan el consumo de aceite de oliva. Hay que destacar que todas ellas han mostrado una evolución a lo largo del tiempo y, así, han incluido consejos sobre seguridad alimentaria, estilo de vida (actividad física o entornos sociales) y sostenibilidad. El símbolo visual que les acompaña es variado: rueda, rombo, pirámide (Figura 6), plato (Figura 7), siendo las dos últimas las más utilizadas en la actualidad (Alonso y Castellano, 2007; Vázquez, 2017).

La base de la pirámide corresponde a los alimentos y bebidas para los que se recomienda un consumo diario y en el vértice se muestran los alimentos

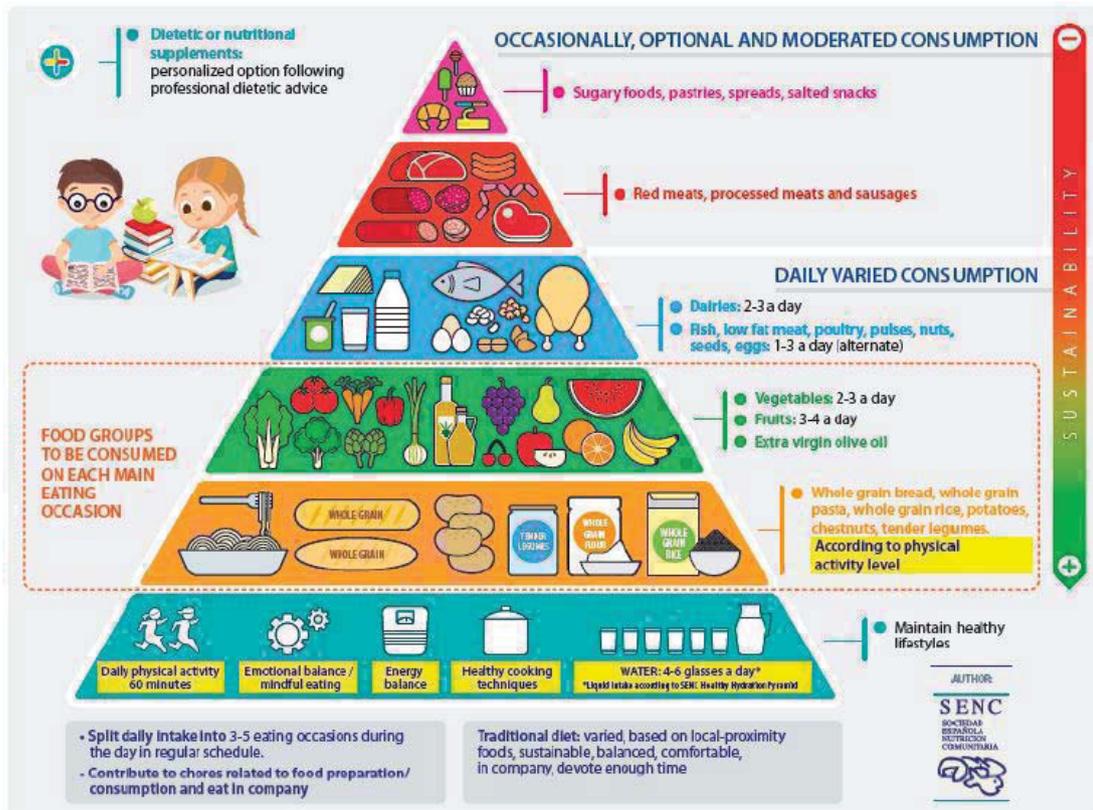


Figura 6. Pirámide de la alimentación saludable en niños y adolescentes (Aranceta-Bartrina, 2019)

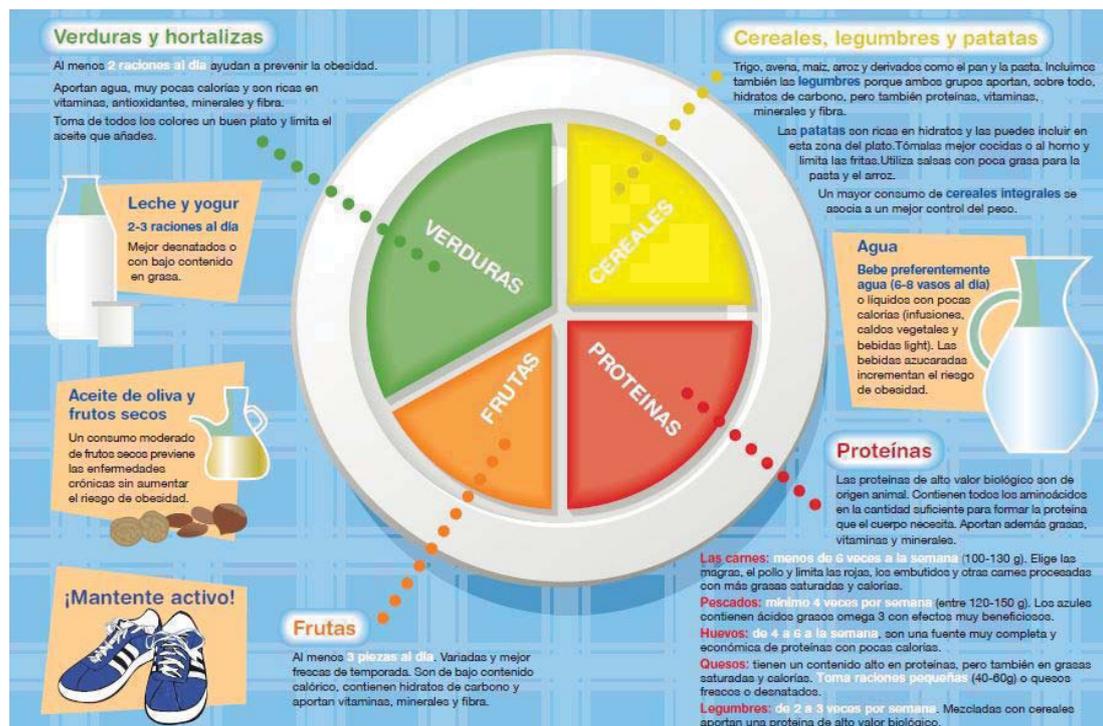


Figura 7. El plato ideal (SEEDO/SEEN, 2012)

y bebidas que deben consumirse ocasionalmente. En el caso del plato, los sectores de superficie más grande se relacionan con un mayor número de raciones recomendadas.

### 2.2.5.3 Objetivos nutricionales

Como complemento a los requerimientos de nutrientes se desarrollaron los objetivos nutricionales para prevenir las ENT. La SENC estableció en el año 2011 una serie de objetivos nutricionales para cumplir a medio plazo (intermedios, para ser evaluados a finales de 2015) y a largo plazo (finales, para ser evaluados a finales de 2020) para la población española (Tabla 5).

Estos objetivos, son similares a los de otros países europeos y a los de EE. UU., con unas pequeñas diferencias respecto a la grasa. El aporte energético de las grasas puede alcanzar el 35% del total para la población española, siempre y cuando el aceite de oliva sea la grasa de adición mayoritaria (Serra y Aranceta, 2011).

**Tabla 5.** Objetivos nutricionales para la población española. Consenso de la Sociedad Española de Nutrición Alimentaria (Serra y Aranceta, 2011).

	Objetivos intermedios	Objetivos finales
<b>Lactancia materna</b>	6 meses	≥1 año
<b>Fibra dietética</b>	>12 g/1000 kcal (>22 g/día en mujeres y 30 g/día en hombres)	>14 g/1000 kcal (>25 g/día en mujeres y 35 g/día en hombres)
<b>Folatos</b>	300 µg EDF/día	>400 µg EDF/día
<b>Calcio</b>	≥800 mg/día	1000 mg/día
<b>Sodio (sal común)</b>	<7 g/día	<5 g/día
<b>Yodo</b>	150 µg/día	150 µg/día
<b>Flúor</b>	1 mg/día	1 mg/día
<b>Grasa Total (% E)</b>	≤35%	30-35%
<b>AGS</b>	≤10%	7-8%
<b>AGMI</b>	20%	20%
<b>AGPI</b>	4%	5%
<b>AGPI ω-6</b>	2% de E, linoleico	3% de E, linoleico
<b>AGPI ω-3</b>	1-2%	1-2%
<b>Colesterol</b>	<350 mg/día	<300 mg/día
<b>CH (% E)</b>	>50%	50-55%
<b>Frutas</b>	>300 g/día	>400 g/día
<b>Verduras y otras hortalizas</b>	>250 g/día	>300 g/día
<b>Actividad física</b>	PAL >1,60 (>30 min/día)	PAL >1,75 (>45-60 min/día)
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	21-25	21-23 (>65 años: 23-26)

E: Energía. EDF: Equivalentes dietéticos de folato. AGS: Ácidos grasos saturados. AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados. AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados. ω: omega. CH: Carbohidratos. PAL: Nivel de actividad física (*physical activity level*). IMC: Índice de masa corporal.

#### 2.2.5.4 Agua

El agua es el componente mayoritario del cuerpo humano, constituyendo entre el 55% y el 60% de su peso corporal total, aunque varía con la edad. Para un niño de 1 año (10 kg) representa el 60% de su peso corporal (Iglesias *et al.*, 2011). Además de ser el más abundante, es un nutriente esencial para la homeostasis celular y la vida, por lo que es necesario ingerirla. Esta ingesta puede hacerse en forma de agua de bebida, otras bebidas líquidas y la contenida en los alimentos. Sus funciones son muy variadas: estructurales, transporte de sustancias de desecho para su eliminación, mantenimiento de la temperatura corporal y lubricante, entre otras (De Burgos *et al.*, 2017).

El balance hídrico es la diferencia entre la ingesta de líquidos en la dieta más la producida en el metabolismo de los macronutrientes y las pérdidas por orina, heces y evaporación. Hay que destacar que la estimación de requerimientos de agua es complicada debido a factores como la edad, sexo, actividad física, temperatura ambiente, altitud, dieta, densidad de la orina, etc. Los niños son más susceptibles a sufrir desequilibrio hídrico puesto que los requerimientos de agua son muy elevados por su mayor superficie corporal y metabolismo basal en relación con su peso corporal (Moreiras *et al.*, 2018).

La EFSA (2010a) estableció la IA de agua total para prevenir los efectos perjudiciales de la deshidratación a nivel metabólico y funcional, en individuos que practican una actividad física moderada y viven en climas con temperaturas moderadas. En la Tabla 6 se muestran las IA para la población preescolar. Estos valores se refieren a la cantidad total de agua ingerida a través del agua de bebida, otros líquidos y alimentos. Se debe considerar que en ciertos procesos infecciosos que cursen con fiebre, vómitos y diarrea se amplían las necesidades.

**Tabla 6.** Ingesta adecuada de agua para la población preescolar (EFSA, 2010a).

Ingesta adecuada	Grupo de edad		
	6-12 meses	1-2 años	2-3 años
ml/día	800-1000	1100-1200	1300

#### 2.2.5.5 Energía

La energía se aporta a partir de los hidratos de carbono, proteínas, grasas y alcohol de la dieta. Es importante mantener el balance energético entre la ingesta energética y el gasto energético, con objeto de controlar el peso corporal y prevenir la obesidad. Al gasto energético total diario contribuyen tres componentes:

- El metabolismo basal (65-70%): es la energía consumida para mantener las funciones corporales y la homeostasis (respiración y circulación, mantenimiento de la temperatura corporal, síntesis de compuestos orgánicos, etc.).
- La actividad física (20-30%): es el componente más variable del gasto energético debido al tipo, intensidad y duración de la actividad física.

- La termogénesis (5-10%): es la energía empleada en la absorción intestinal, las transformaciones bioquímicas y el almacenamiento de nutrientes.

Además, en los escolares, hay que añadir el gasto debido al crecimiento, que comprende la energía depositada en forma de proteínas y grasa más el gasto de su síntesis, y supone un consumo aproximado de 5 kcal/g de tejido aumentado (Navia y Ortega, 2006; Requejo y Ortega, 2015).

Para el cálculo de necesidades energéticas, en España se utilizan las IR de energía, que son el nivel de ingesta correspondiente al gasto energético para un tamaño y composición corporal y a un nivel de actividad física determinado. Las recomendaciones nutricionales para establecer el gasto energético total se consideran las mismas para niños y niñas hasta la edad de 10 años y suele expresarse por kg de peso. Los requerimientos energéticos para el grupo de edad de 7 a 12 meses son de 950 kcal/día y para el grupo de 1-3 años son de 1250 kcal/día (Moreiras *et al.*, 2018).

### **2.2.5.6 Macronutrientes**

#### **2.2.5.6.1 Proteínas**

Las proteínas están formadas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Su principal función es la estructural, pero también destaca su papel transportador de moléculas, función catalítica, inmunológica, homeostática, hormonal, energética (4 kcal/g), reguladora del equilibrio ácido-base y reguladora genética (De Burgos *et al.*, 2017).

En la etapa preescolar y escolar las necesidades proteicas son altas debido a la cantidad adicional para el proceso de crecimiento y desarrollo. En general, la dieta infantil aporta proteínas suficientes y solo hay riesgo de encontrar carencias en los niños que siguen dietas vegetarianas estrictas y mal planificadas, en los que tienen alguna enfermedad o alergia alimentaria o en los que incluyen una selección muy limitada de alimentos en sus dietas (Requejo y Ortega, 2015).

La cantidad de ingesta de proteínas que propone la EFSA (2012) para niños es de: 9 g/día a los 6 meses, 12 g/día entre los 1 y 2 años y 13 g/día a los 3 años. Las cantidades son similares para niñas: 9 g/día a la edad de 6 meses, 11 g/día al año, 12 g/día a los 2 años y 13 g/día a los 3 años de edad.

Otra manera de expresar las necesidades es como porcentaje de la ingesta total energética. El FNB utiliza la denominación de rangos aceptables de distribución de macronutrientes (AMDR, *Acceptable Macronutrient Distribution Range*), que son los rangos de ingesta de los macronutrientes relacionados con la reducción del riesgo de desarrollar ENT mientras que se aporte la cantidad de otros nutrientes esenciales.

En relación a este concepto, las recomendaciones de proteína expresadas como porcentaje de aporte calórico al total de la dieta se sitúan alrededor del

12%, no superando el 15% (Serra y Aranceta, 2011; Ortega *et al.*, 2014a). De ese porcentaje, un 50-65% debe provenir de proteína de origen animal por su riqueza en aminoácidos esenciales (Requejo y Ortega, 2015).

#### 2.2.5.6.2 Lípidos

Los lípidos son la principal reserva de energía del organismo (9,3 kcal/g), forman parte de las membranas celulares, vehiculizan las vitaminas liposolubles (A, D, E, K), son precursores de hormonas esteroideas, prostaglandinas, y sales biliares, aportan ácidos grasos esenciales (ácido linoleico y linolénico) y confieren palatabilidad a los alimentos.

Los lípidos se pueden clasificar en saponificables (lípidos simples: acilglicéridos y ceras, y lípidos complejos: fosfolípidos y glicolípidos) e insaponificables (esteroides, terpenos y prostaglandinas).

Los triglicéridos constituyen el grupo lipídico más importante, y están formados por tres moléculas de ácidos grasos (cadena hidrocarbonada con un grupo carboxilo en el extremo alfa y un grupo metilo en el extremo omega) y una de glicerol. Los ácidos grasos (AG) se dividen en saturados (AGS), con enlaces simples entre sus átomos de carbono e insaturados (AGI), con enlaces dobles o triples.

Entre los AGS, el más frecuente es el palmítico (presente en aceites vegetales, aceites de pescado, leche y derivados lácteos, y grasa de mamíferos) y otros comunes son el esteárico, láurico y mirístico.

Entre los AGI, son de gran importancia los AG esenciales, que deben ser aportados en la dieta. Se trata de los AG poliinsaturados (AGPI):  $\alpha$ -linolénico (aceites de soja, linaza, nueces), del que derivan el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (ambos  $\omega$ -3), y linoleico (aceites vegetales), precursor del ácido araquidónico ( $\omega$ -6). Los AGPI  $\omega$ -3 tienen efectos beneficiosos durante la infancia (desarrollo del sistema nervioso, desarrollo cognitivo y función visual) y como factor de protección en la enfermedad coronaria, hipertensión, diabetes, cáncer y otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Gebauer *et al.*, 2006). Los  $\omega$ -6 (linoleico) ayudan al control glucémico y una reducción del riesgo de diabetes.

El ácido oleico (ácido graso monoinsaturado, AGMI) no es esencial y es el más abundante en la dieta (aceite de oliva, aceite de colza, frutos secos), siendo precursor de la familia  $\omega$ -9. Se ha relacionado con cambios beneficiosos como la reducción del colesterol LDL, de los triglicéridos y del cociente colesterol total y un aumento del colesterol HDL (Mensink, 2003).

En los AGPI, los dobles enlaces pueden presentar configuración *cis* o *trans* según la orientación espacial de los átomos de hidrógeno enlazados a los carbonos. En los isómeros *cis* los grupos semejantes se encuentran en el mismo lado del doble enlace y le confiere a la molécula puntos de fusión bajos (estado líquido a temperatura ambiente). Sin embargo, los isómeros *trans*

presentan los grupos en el lado opuesto. El principal origen de los AG *trans* en la dieta procede de la hidrogenación industrial de aceites vegetales con el fin de solidificar grasas, aumentar la estabilidad del producto y su conservación. Otras dos fuentes de AG *trans* son el calentamiento de aceites a altas temperaturas y la biohidrogenación ruminal, por la que las bacterias del rumen transforman los AGI en AGS produciendo como producto intermedio AG *trans*, presentes en los productos lácteos y cárnicos de rumiantes.

El colesterol es exclusivo de tejidos animales y es una sustancia lipídica de extraordinaria importancia biológica ya que es un componente estructural de las membranas celulares, participa en la síntesis de hormonas esteroideas, de la vitamina D, así como de los ácidos biliares que facilitan la digestión y absorción de las grasas de la dieta. La hipercolesterolemia está relacionada con un aumento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares a largo plazo, por lo que debe disminuirse su consumo desde la infancia (De Burgos *et al.*, 2017).

Las recomendaciones de lípidos expresadas como porcentaje de la ingesta total energética son entre un 30 y un 35% (Serra y Aranceta, 2004; SENC, 2011), mientras que la EFSA (2010b), propone un 40% de la energía total en el período de alimentación complementaria de 6 a 12 meses, y entre el 35 y 40% en el segundo y tercer año de vida.

#### 2.2.5.6.3 Hidratos de carbono

La misión principal de los carbohidratos o glúcidos es energética, aunque algunos hidratos de carbono pueden tener una función estructural o funcional cuando van unidos a proteínas o lípidos.

Desde el punto de vista dietético se pueden clasificar en:

- Simples o azúcares:
  - o Monosacáridos (glucosa, fructosa y galactosa).
  - o Disacáridos: maltosa, sacarosa y lactosa.
  - o Oligosacáridos: dextrinas.
- Complejos o polisacáridos:
  - o Digeribles: almidón digerible y glucógeno.
  - o No digeribles (90% fibra alimentaria): almidón no digerible y celulosa.

Los glúcidos complejos se encuentran en los cereales, las legumbres y las verduras, y los sencillos forman parte de la bollería, pasteles, golosinas, etc. (De Burgos *et al.*, 2017).

Los objetivos nutricionales establecen que los hidratos de carbono deben contribuir al aporte energético total con un 50-55%, preferiblemente con un porcentaje bastante mayor de hidratos de carbono complejos (SENC, 2011).

El rango que propuso la EFSA (2010c) es más amplio, entre un 45 y 60% del aporte de energía diario. Además, recomiendan que los azúcares añadidos no representen más del 10% de energía total. En este sentido, la OMS establece este mismo límite para los hidratos de carbono sencillos recomendando limitar especialmente los azúcares refinados (sacarosa, fructosa, edulcorantes a base de almidón), presentes en productos como las bebidas azucaradas, bollería, pastelería y golosinas, con el fin de prevenir la obesidad y la caries dental (OMS, 2015).

### **2.2.5.7 Fibra dietética**

La fibra dietética se define como el residuo vegetal no digerible al no ser degradado por las enzimas del tracto gastrointestinal. Las funciones de la fibra están relacionadas principalmente con la regulación de las funciones digestivas (retención de agua, estimulación de la motilidad intestinal, efecto laxante, enlentecimiento del vaciamiento gástrico, sensación de saciedad), pero también tienen valor nutricional como fuente de energía (produce AG de cadena corta) y otras funciones de regulación del metabolismo (disminución de los niveles de colesterol sérico y glucemia, fijación de cationes). Debido a varias de estas funciones se le ha atribuido ser un factor de protección frente a cánceres intestinales y ENT.

La fibra alimentaria, bajo una perspectiva fisiológica, se puede dividir en fibra soluble e insoluble. Y, en función del grupo químico se dividen en:

- Polisacáridos (hidratos de carbono complejos no digeribles).
  - o Almidón no digerible o resistente (insoluble).
  - o Polisacáridos no almidonáceos: celulosa (insoluble) y hemicelulosa (algunas insolubles y otras solubles) y pectinas (soluble).
- No polisacáridos: lignina (insoluble).

La fibra alimentaria se encuentra en las verduras y otras hortalizas, frutas, legumbres, cereales y derivados, y frutos secos (De Burgos *et al.*, 2017).

En España, carecemos de IA de fibra dietética en niños, por lo que se debería basar en los objetivos nutricionales de adultos o recomendaciones de otros países. Por ejemplo, la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN, *European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) considera que la ingesta diaria de fibra dietética debe ser superior a 10 g en la edad escolar e ir aumentando durante la adolescencia hasta alcanzar la recomendación para adultos (Aggett *et al.*, 2003). En EE. UU. se recomienda para niños sanos mayores de 2 años y hasta los 18, la cantidad de fibra que resulte de sumar 5 g/día y su edad. El margen de seguridad es la cantidad de fibra en gramos equivalente a la edad del niño (en años) a la que se suman 10 g por día (Williams, 1995).

Por último, aunque en niños el efecto de la fibra dietética está menos documentado, existen trabajos que asocian la ingesta de fibra en la infancia con beneficios a corto y largo plazo (Kranz *et al.*, 2012).

### **2.2.5.8. Micronutrientes**

#### **2.2.5.8.1 Vitaminas**

Son sustancias orgánicas complejas que carecen de valor energético, pero su aporte exógeno es esencial para el ser humano porque no las puede sintetizar o lo hace en cantidad insuficiente. Por lo tanto, son necesarias en la dieta en pequeñas cantidades y se debe prestar atención al procesado de los alimentos porque son sensibles al calor, oxidación y otros procesos químicos. Su función principal se relaciona con la regulación de los procesos metabólicos y tanto la carencia como el exceso de su ingesta pueden resultar perjudiciales y provocar trastornos (De Burgos *et al.*, 2017).

La clasificación más aceptada se basa en su solubilidad. Las vitaminas hidrosolubles son de gran importancia al participar como cofactores o cosustrato de sistemas enzimáticos y en reacciones del metabolismo energético de hidratos de carbono, proteínas y ácidos nucleicos. La deficiencia clínica de vitaminas hidrosolubles es poco frecuente y el exceso no es peligroso porque no se acumulan en el organismo y se excretan por la orina. Las vitaminas liposolubles tienen funciones más especializadas que las hidrosolubles. Se almacenan en el organismo, por lo que si la ingesta es excesiva pueden ocasionar fenómenos de toxicidad (De Burgos *et al.*, 2017). En las Tablas 7 y 8 se resumen las principales propiedades y fuentes de las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, respectivamente.

**Tabla 7.** Propiedades y funciones de las vitaminas hidrosolubles (Kraemer *et al.*, 2012; Ortega *et al.*, 2014a; De Burgos *et al.*, 2017).

Vitamina	Propiedades	Fuentes
Tiamina (B <sub>1</sub> )	Participa en el metabolismo de los hidratos de carbono y en los procesos de transmisión nerviosa	Alimentos de origen vegetal (cereales, legumbres, levadura), y animal (hígado, leche, huevos y pescado)
Riboflavina (B <sub>2</sub> )	Precursora de coenzimas (FMN y FAD), que intervienen en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas	Leche y derivados fuente principal y en muchos otros alimentos
Niacina (B <sub>3</sub> )	Origina dos coenzimas (NAD y NADPH), con un papel esencial en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos	Pescados, vísceras, carnes, huevos, leche, cereales y leguminosas
Ácido pantoténico (B <sub>5</sub> )	Componente de la coenzima A, que participa en numerosas reacciones del metabolismo de lípidos y energético	Ampliamente distribuido en los alimentos
Piridoxina (B <sub>6</sub> )	Coenzima de gran número de reacciones del metabolismo de aminoácidos, lípidos e hidratos de carbono y también participa en la formación de anticuerpos y eritrocitos	Cereales integrales, legumbres, carne y pescado
Biotina (B <sub>7</sub> )	Coenzima en las reacciones de carboxilación y transcarboxilación y, por tanto, en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y de aminoácidos	Huevo, hígado, riñón, levadura y leche
Ácido fólico (B <sub>9</sub> )	Biosíntesis de ácidos nucleicos y de algunos aminoácidos. También participa en la maduración celular y previene la anemia megaloblástica	Hortalizas de hoja verde, cereales, legumbres, frutos secos e hígado
Cobalamina (B <sub>12</sub> )	Se comporta como coenzima en la síntesis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Interviene en la eritropoyesis y en el mantenimiento de células nerviosas, por lo que previene la anemia megaloblástica y las alteraciones neurológicas	Hígado, riñón, sesos, carnes, pescados, huevos, leche y derivados
Ácido ascórbico (C)	Agente reductor y antioxidante, participa en la biosíntesis de colágeno y carnitina. También favorece la absorción intestinal del hierro no hemo y de los folatos	Alimentos de origen vegetal (frutas cítricas, verduras y otras hortalizas) y en los productos de origen animal (hígado)

**Tabla 8.** Propiedades y fuentes de las vitaminas liposolubles (Ortega *et al.*, 2010; Kraemer *et al.*, 2012; Ortega *et al.*, 2014a; De Burgos *et al.*, 2017).

Vitamina	Propiedades	Fuentes
Vitamina A	Desarrollo embrionario, crecimiento, reproducción, función inmune, mantenimiento del tejido epitelial y favorece la visión	Huevo, leche, mantequilla, queso e hígado y hortalizas de hoja verde oscuro, frutas y verduras de color amarillo
Vitamina D	Participa en procesos endocrinos y metabólicos, destacando el mantenimiento de la homeostasia del calcio y fósforo (mineralización ósea, absorción intestinal y reabsorción renal). Presenta un papel modulador en la respuesta inmune y previene la diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer	Pescados grasos (salmón, bacalao, arenque, sardina), huevos, leche y ciertas carnes. Síntesis endógena por exposición a luz solar
Vitamina E	Antioxidante de AGPI protegiendo a las membranas celulares de los radicales libres y, al sistema nervioso, al esquelético y a la retina del daño oxidativo	Aceites vegetales, hortalizas de hoja verde, germen del trigo, maíz, cacahuete, frutos secos, coco, huevo e hígado
Vitamina K	Procesos de coagulación al ser un cofactor necesario para la síntesis de los factores de la coagulación	Hortalizas de color verde intenso, crucíferas, huevo, hígado, queso y otros productos fermentados

Los requerimientos de vitaminas para la población preescolar se cubren satisfactoriamente en el contexto de una dieta equilibrada. Solo en el caso de niños con regímenes dietéticos especiales (vegetarianos o enfermos), podría ser necesario complementar la dieta con suplementos vitamínicos (Requejo y Ortega, 2015). En la Tabla 9 se recogen las ingestas dietéticas recomendadas para vitaminas por el FNB (FNB, 2000).

**Tabla 9.** Ingesta dietética de referencia para vitaminas (FNB, 2000).

Vitamina	7-12 meses	1-3 años
Vitamina D ( $\mu\text{g/d}$ ) <sup>1</sup>	5	5
Tiamina (mg/d)	<i>0,3</i>	0,5
Riboflavina (mg/d)	<i>0,4</i>	0,5
Niacina (mg/d) <sup>1</sup>	4	6
Vitamina B6 ( $\mu\text{g/d}$ ) <sup>1</sup>	<i>0,3</i>	0,5
Folato ( $\mu\text{g/d}$ ) <sup>1</sup>	<i>80</i>	150
Vitamina B12 ( $\mu\text{g/d}$ )	<i>0,5</i>	0,9
Ac. pantoténico (mg/d)	<i>1,8</i>	2
Biotina (mg/d)	<i>6</i>	8
Colina (mg/d) <sup>1</sup>	<i>150</i>	200
Vitamina C (mg/d) <sup>1</sup>	<i>50</i>	15
Vitamina E (mg/d) <sup>1</sup>	<i>5</i>	6

Nota: La tabla presenta ingestas recomendadas (RDA) en tipo de letra normal e ingestas adecuadas (IA) en tipo cursiva.

<sup>1</sup> Nivel máximo de ingesta (UL) para 1-3 años: Niacina, 10 mg/día; vitamina B<sub>6</sub>, 30 mg/día; folato, 300  $\mu\text{g/día}$ ; colina, 1g/día; vitamina C, 400 mg/día; vitamina E, 200 mg/día; vitamina D, 50  $\mu\text{g/día}$ . UL para 7-12 meses: Vitamina D, 25  $\mu\text{g/día}$ .

#### 2.2.5.8.2 Minerales

Son sustancias inorgánicas no energéticas esenciales para el ser humano cuya carencia induce trastornos bioquímicos. Además, algunos minerales son contaminantes ambientales (Hg, Al, Pb, As, Cd, Sn), por lo que su presencia en alimentos superando los límites establecidos pueden provocar trastornos en la salud.

Los minerales se pueden dividir en tres grupos:

- **Macroelementos:** el organismo los necesita en cantidades mayores de 100 mg/día (Ca, P, Na, K, Mg, S y Cl).
- **Microelementos:** se necesitan en cantidades inferiores a 100 mg/día (Fe, Cu, F, Co, Cr, Mn, I, Mo y Se).
- **Oligoelementos o elementos traza:** se precisan cantidades muy pequeñas, del orden de  $\mu\text{g/día}$  (Zn).

Las principales funciones que se les atribuye son la estructural (formación de tejidos y ser parte de macromoléculas) y la reguladora (transmisión neuromuscular, transporte de oxígeno, equilibrio ácido-base, balance hidroeléctrico, cofactores enzimáticos, entre otras) (De Burgos *et al.*, 2017). La Tabla 10 muestra las propiedades y fuentes alimenticias de los minerales.

**Tabla 10.** Propiedades y fuentes de los minerales (Ortega *et al.*, 2014a; De Burgos *et al.*, 2017).

Mineral	Propiedades	Fuentes
Calcio	Formación y mantenimiento de los huesos y dientes, transmisión del impulso nervioso, regulación de la función del músculo cardíaco y también participa en la coagulación	Leche y derivados lácteos, hortalizas de hoja verde oscura, sardinas, legumbres y frutos secos
Fósforo	Desarrollo y mantenimiento de huesos y dientes, contribuye al equilibrio ácido-base, participa en la actividad nerviosa y muscular y forma parte de diferentes moléculas (ATP, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas)	Carnes, pescados, huevos, lácteos, frutos secos, legumbres
Hierro	Formación de hemoglobina y cofactor de enzimas en reacciones redox. También interviene en la actividad del sistema inmunitario, síntesis de neurotransmisores y utilización de las vitaminas del grupo B	Hierro hemo (hígado, carnes, pescados) y no hemo en alimentos de origen vegetal (legumbres y algunas hortalizas de hoja verde)
Magnesio	Componente de huesos y dientes, contribuye al equilibrio ácido-base, interviene en la actividad neuromuscular y es un cofactor de más de 300 enzimas	Ampliamente repartido entre los alimentos
Zinc	Interviene en la síntesis de los principios inmediatos, regulación del crecimiento óseo, desarrollo de órganos sexuales y funcionamiento del sistema inmunológico. Relevancia en el funcionamiento del gusto, el olfato y la visión nocturna	Carnes magras, hígado, ostras, almejas, huevos y leche
Yodo	Componente de las hormonas tiroideas y participa en el metabolismo de los macronutrientes	Mariscos y pescados de mar y sal yodada
Potasio	Interviene en el mantenimiento del equilibrio ácido-base y balance hídrico y osmótico, participa en la transmisión del impulso nervioso y en la actividad muscular	Fruta, verduras, hortalizas, legumbres y cereales
Sodio	Mantenimiento del equilibrio ácido-base y el hidrosalino, así como en la transmisión del impulso nervioso y en la actividad muscular	Sal de mesa, leche, carnes rojas, aves, pescado y huevo
Selenio	Antioxidante	Nueces, mariscos, vísceras, carne roja y de aves de corral
Flúor	Fortifica los huesos y el esmalte dental	Fluoración del agua potable

En la Tabla 11 se recogen las ingestas dietéticas de minerales recomendadas por el FNB (FNB, 2000).

**Tabla 11.** Ingestas dietéticas recomendadas para minerales (FNB, 2000).

Grupo de edad	Calcio <sup>1</sup> (mg/d)	Fósforo <sup>1</sup> (mg/d)	Magnesio <sup>1</sup> (mg/d)	Flúor <sup>1</sup> (g/d)	Selenio (µg/d)
<b>7-12 meses</b>	270	275	75	0,5	20
<b>1-3 años</b>	500	460	80	0,7	20

Nota: La tabla presenta ingestas recomendadas (RDA) en tipo de letra normal e ingestas adecuadas (IA) en tipo cursiva.

<sup>1</sup> Nivel máximo de ingesta tolerable (UL) para 1-3 años: Calcio, 2,5 g/día; fósforo, 3 g/día; selenio, 90 µg/día; magnesio, 65 mg/día; flúor, 1,3 mg/día. UL para 7-12 meses: Selenio, 60 µg/día; flúor 0,9 mg/día.

## 2.2.6 Requisitos de la dieta infantil

### 2.2.6.1 Características de los principales grupos de alimentos

La dieta del niño debe ser variada para conseguir que sea equilibrada y contenga los nutrientes necesarios. El concepto de dieta variada puede ser muy relativo por lo que más que variedad importa la proporción en la que se incluyen alimentos de los distintos grupos (Requejo y Ortega, 2015).

#### 2.2.6.1.1 Cereales

Los cereales y productos derivados (pan, pasta, arroz, etc.), junto con otros alimentos ricos en hidratos de carbono complejos, son la base de una alimentación adecuada. Los cereales más recomendados son los de grano entero, es decir, que en el alimento (grano intacto, descascarillado, molido, fragmentado o en copos), están presentes los tres componentes del cereal (endospermo, germen y salvado), porque aportan vitaminas del complejo B, vitamina E, minerales, fibra, presentando también un menor índice glucémico (EFSA, 2010d).

Se asocia un mayor consumo de cereales de grano entero con menor riesgo de enfermedad y mortalidad total (Wei *et al.*, 2016). Por lo tanto, se debe priorizar el consumo de cereales y sus derivados elaborados mayoritariamente con harinas de grano entero y tener un menor consumo de alimentos elaborados con harinas refinadas o de menor contenido en fibra. También hay que tener en cuenta las técnicas culinarias que favorecen un menor índice glucémico (SENC, 2016).

#### 2.2.6.1.2 Legumbres

El consumo de legumbres se debe estimular por ser una fuente importante de energía y nutrientes. Destaca el aporte de proteína vegetal (20-30%) de alto valor biológico no asociada a grasas saturadas. Su componente mayoritario son los hidratos de carbono complejos (50-55%), al contrario que los lípidos

que solo constituyen un 2-5%, mayoritariamente poliinsaturados. En cuanto a minerales y vitaminas contribuyen con vitaminas del grupo B, vitamina K, calcio, magnesio, hierro y potasio y también es interesante su aportación en fibra soluble e insoluble (15-20 g/100 g) (SENC, 2016).

Como ya se ha señalado, su aspecto más destacable es el aporte proteico de calidad de origen vegetal. La sustitución de algunas raciones de carne a la semana por legumbres podría tener un impacto positivo en el control del peso y en la prevalencia de ENT (Kouris-Blazos y Belski, 2016).

#### 2.2.6.1.3 Verduras y otras hortalizas

Las verduras y otras hortalizas son ricas en fibra, vitaminas (vitamina C, carotenos), minerales, tienen un alto contenido en agua y un bajo aporte de calorías (50 kcal/100 g) (SENC, 2016). Se asocian con un papel protector sobre distintas ENT (Wang *et al.*, 2014).

No obstante, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), en un informe de 2011, con el fin de evitar la metahemoglobinemia producida por la ingestión de nitratos, recomendó no incluir en la dieta las espinacas ni las acelgas antes del primer año de edad y, en caso de hacerlo, su contenido no debía exceder el 20% del contenido total del puré. Para niños de 1 año a 3 la recomendación fue no ofrecer más de una ración de espinacas y/o acelgas al día (AECOSAN, 2011a). Esta Agencia, acaba de actualizar estas recomendaciones para bebés y niños de corta edad en base a una evaluación del riesgo realizada a partir de la información científica más reciente, aplicándose a espinacas, acelgas y borrajas (AESAN, 2020a).

#### 2.2.6.1.4 Frutas

Las frutas tienen interés nutricional por su aporte de vitaminas (folatos, vitamina C, carotenos, vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, niacina y vitamina E) y minerales (magnesio y potasio, principalmente). El aporte energético del grupo es bajo (con excepción del plátano, aguacate, coco o aceitunas), con una media de alrededor de 40 kcal/100 g. Contienen fibra, que ayuda a regular la función intestinal, y su contenido en agua puede llegar a alcanzar más del 90% (SENC, 2016).

Los zumos de fruta comerciales no aportan beneficio nutricional y no se deberían introducir antes del primer año de vida. En el grupo de edad de 1 a 3 años, se puede sustituir solo una de las raciones de fruta recomendadas diariamente por un zumo de fruta natural y se tiene que preparar lo más próximo a su consumo, como en el caso de las frutas troceadas (Heyman y Abrams, 2017). Las frutas en conserva y las mermeladas son una opción ocasional y siempre en formatos sin azúcares añadidos o con baja concentración de azúcares (Aasheim *et al.*, 2015). Las frutas desecadas son una alternativa a los edulcorantes y como acompañante en distintos platos (Carughi *et al.*, 2016). Por su parte, las aceitunas son fuente importante de AGMI y vitamina E, siendo una buena opción frente a otros aperitivos (Ghanbari *et al.*, 2012).

#### **2.2.6.1.5 Carnes y derivados cárnicos**

Los alimentos del grupo de carnes y derivados cárnicos son una fuente básica de proteínas de alto valor biológico, lípidos, vitaminas (principalmente del grupo B) y minerales (hierro-hemo, zinc, potasio y selenio).

En este grupo hay que diferenciar entre las carnes blancas y las carnes rojas. El término carnes blancas, de color más pálido debido a un menor contenido en mioglobina, hace referencia a la carne de conejo, aves de corral y a las de cordero y cerdo dependiendo de la edad del animal, de la alimentación del mismo y del corte. Se recomienda un mayor consumo de estas carnes por su bajo contenido en grasas saturadas y menor aporte energético y de colesterol, aunque la composición y contenido graso varía en función de la especie animal, edad, sexo, tipo de crianza, alimentación o el corte (SENC, 2016).

EN 2015, la OMS publicó un informe en base a varios estudios (Sinha *et al.*, 2009; Bouvard *et al.*, 2015) en el que reflejaba la asociación entre el consumo de carne roja (buey, ternera, cerdo, cordero, oveja, cabra y caballo) y el desarrollo de cáncer colorrectal. El procesado a altas temperaturas de esta carne que genera pardeamiento y zonas quemadas (asado, plancha, brasa), puede formar compuestos potencialmente carcinogénicos (N-nitrosos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y aminas heterocíclicas). También se ha relacionado el consumo de carnes rojas y procesadas con un mayor riesgo de todas las causas de mortalidad (Larsson y Orsini, 2014).

#### **2.2.6.1.6 Pescados y mariscos**

Los pescados y mariscos aportan proteínas de buena calidad, un perfil lipídico rico en AGPI, minerales y oligoelementos (yodo, selenio, zinc o calcio) y algunas vitaminas como la A y D.

El perfil graso varía según la especie y la estacionalidad. Los pescados blancos o magros (merluza, bacalao, pescadilla, etc.) contienen menos del 1% de grasa, los semigrasos (trucha, emperador, palometa, etc.) entre el 1 y el 7%, y los azules o grasos (atún, sardina, anchoa, etc.) más del 7%, siendo ricos en  $\omega$ -3 (SENC, 2016).

El consumo de pescado tiene beneficios en toda la población, pero en 2011 la AECOSAN alertó del riesgo de intoxicación por mercurio al ingerir pescados de gran tamaño, por lo que desaconsejó el consumo de atún rojo, pez espada, tiburón y lucio en los niños menores de 3 años. Teniendo en cuenta los últimos datos de publicaciones y estudios, la AESAN ha actualizado estas recomendaciones en favor de especies de bajo contenido en mercurio y evitando el consumo de las 4 citadas en niños de hasta 10 años y mujeres embarazadas (AECOSAN, 2011b; AESAN, 2019a).

#### **2.2.6.1.7 Huevos**

El huevo es un alimento con elevada densidad nutricional cuyos nutrientes presentan una gran biodisponibilidad. Tiene proteínas de alto valor biológico-

co, AGPI  $\omega$ -3, vitaminas A, D, E y del grupo B, colina, hierro, selenio, etc. (SENC, 2016).

Sin embargo, su consumo se restringió por su alto contenido en colesterol, aunque en las últimas décadas hay datos que no le atribuyen un mayor riesgo cardiovascular, incluso algunos estudios han encontrado un menor riesgo de diabetes tipo 2 en aquellos individuos con mayor consumo de huevos (Rong *et al.*, 2013; Virtanen *et al.*, 2015). Por tanto, para los individuos con niveles séricos de colesterol normales, la ingesta moderada de huevos no debe ser motivo de preocupación (López-Sobaler y Aparacio, 2014) y constituye, junto a la alternancia con pescados, legumbres y frutos secos, una excelente alternativa proteica para el excesivo consumo de carne.

#### **2.2.6.1.8 Leche y derivados lácteos**

La leche y sus derivados son fuente de proteínas de buena calidad, lactosa, vitaminas del grupo B, vitamina A, vitamina D y minerales, entre los que destaca el calcio (SENC, 2016).

Hay controversia respecto a si los niños deben tomar leche entera, con elevado contenido en AGS y colesterol, o leche baja en grasa. Parece razonable que los escolares con obesidad o sobrepeso consuman lácteos con reducido contenido en grasa, mientras que los niños con un estado de salud óptimo tomen leche entera que les asegure el aporte de vitaminas liposolubles, entre ellas la vitamina D que, junto al calcio, favorecen la formación ósea en niños (Weaver, 2015). Además, se ha demostrado que la grasa láctea constituye una fuente natural de compuestos bioactivos (ácido butírico, ácido linoleico conjugado, fosfolípidos y esfingolípidos) con beneficio a la salud humana (Calvo *et al.*, 2014).

#### **2.2.6.1.9 Frutos secos y semillas**

Es un grupo de interés en la dieta mediterránea como aperitivo, acompañante o en repostería (almendras, avellanas, nueces, anacardos, pistachos, piñones, etc.). Se caracterizan por ser muy energéticos y ricos en nutrientes esenciales como aminoácidos y proteínas, lípidos (AGI), vitaminas (vitamina E, folatos), minerales (selenio, magnesio, potasio, calcio, zinc), oligoelementos, fibra y con un contenido de agua inferior al 50% (SENC, 2016).

Su consumo se ve favorecido porque tienen la capacidad de saciar y prevenir enfermedades intestinales (estreñimiento) y diversas ENT (Afshin *et al.*, 2014). Se recomienda su consumo crudo o ligeramente tostados y sin azúcar, sal y/o grasas añadidos (SENC, 2016).

#### **2.2.6.1.10 Aceites**

Debe ser prioritario el consumo de aceite de oliva virgen como principal grasa de adición. Se utiliza tanto en crudo (como aderezo en ensaladas y para untar en pan), como para frituras, guisos o asados. Se ha descrito como patrón ali-

mentario saludable en la dieta mediterránea gracias a su composición rica en AGMI (hasta un 80% de ácido oleico) y a sus componentes menores (escualeno, esteroides, pigmentos y compuestos fenólicos) (SENC, 2016). El suplemento de la dieta mediterránea con aceite de oliva virgen extra ha mostrado una menor incidencia de ENT y de mortalidad por todas las causas (Estruch *et al.*, 2018).

Los aceites de semillas, como los de girasol, soja y maíz, son otra alternativa y aportan AGPI, en especial el ácido linoleico. En la industria alimentaria, por su bajo coste, se utilizan otros aceites no tan deseables por ser ricos en AGS y AG *trans* (aceites de palma y coco). Están presentes en muchos alimentos preparados, por lo que su consumo se debe limitar al máximo (Alonso y Castellano, 2007).

Ya se ha mencionado que el aceite de oliva se puede usar para untar. Otras grasas untables son la margarina, de origen vegetal, y la mantequilla, de origen animal. Su consumo tiene que ser opcional, ocasional y moderado por el contenido de AG *trans* de la primera y por el elevado contenido en grasa total, especialmente de AGS, de la segunda (SENC, 2016).

#### **2.2.6.1.11 Bollería, pastelería y productos azucarados**

Los productos de bollería, pastelería y repostería, junto a los productos de confitería (llamados coloquialmente chucherías), son alimentos con valor energético alto (310-560 kcal/100 g) compuestos por un 10-40% de grasas (AGS 45-64% y AG *trans* 0,7-14%) y un 35-70% de hidratos de carbono (de los cuales son azúcares entre el 6 y el 25%).

Los azúcares son hidratos de carbono sencillos que se pueden encontrar de forma natural (fruta, lácteos, miel), o añadidos en alimentos para mejorar su sabor y otras características organolépticas (SENC, 2016).

No se ha encontrado una correlación convincente entre el consumo de azúcar y el riesgo de cáncer, pero parece predisponer a ENT y sí hay una asociación evidente entre el consumo de azúcares sencillos y la caries dental (Te Morenga *et al.*, 2013). Para prevenir la caries dental se debe limitar la frecuencia de consumo de productos dulces fermentables y bebidas azucaradas por debajo de 3-4 veces/día, además de mantener una buena higiene buco-dental diaria (SENC, 2011).

Es por este motivo que el azúcar no es un nutriente esencial, unido a que produce elevaciones bruscas de la glucemia. Por tanto, su consumo debe ser opcional, ocasional y moderado. La misma recomendación se debe seguir para los productos de bollería y pastelería, priorizando el consumo de repostería elaborada en casa con métodos e ingredientes tradicionales.

#### **2.2.6.1.12 Sal y alimentos salados**

Se estima que un 70-75% de la sal consumida procede de alimentos procesados y consumidos fuera del hogar. Las evidencias científicas relacionan

el consumo de productos salados con un incremento de la hipertensión y, por tanto, con el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y accidente cerebrovascular. Por ello, la OMS recomienda reducir la cantidad de sodio consumida a 2 g (5 g de sal) en adultos y de una manera proporcional a las necesidades energéticas del niño (OMS, 2013). Las recomendaciones de la Asociación Española de Pediatría (AEP) son de 2 g de sal/día (0,8 g de sodio) para los niños de 1 a 3 años y de 2 g de sal/día (menos de 0,4 g de sodio) hasta los 12 meses, por lo que no debe añadirse sal a la alimentación complementaria (Gómez *et al.*, 2018).

El sector de los frutos secos y aperitivos salados (*snacks*) ha tenido un aumento de ventas en los últimos años. Se está haciendo un esfuerzo en su reducción, aunque no se halló ninguna variación estadísticamente significativa entre los análisis de 2009 y 2012 del Plan de reducción de consumo de sal en España (AECOSAN, 2015). El contenido medio de sal en los aperitivos salados es del 1,26% (frutos secos excluidos a pesar de representar el mayor porcentaje de ventas en el sector). Además, pueden aportar exceso de azúcares y conservantes.

#### **2.2.6.2 Distribución de las comidas**

El patrón de distribución de comidas más recomendable para los niños es similar al del adulto, con cuatro o cinco ingestas diarias, y con la siguiente distribución porcentual de energía: 25% en el desayuno, 30% en la comida, 15% en la merienda y 30% en la cena. Si bien, en el caso de los más pequeños, es conveniente una quinta comida a media mañana disminuyendo el aporte calórico en el resto de comidas con el objeto de evitar períodos amplios de ayuno y el picoteo entre horas (Muñoz y Martí, 2008; Requejo y Ortega, 2015).

El desayuno es una de las comidas del día más importante y tiene que representar del 20 al 25% de la ingesta energética total diaria para que el niño en edad escolar y preescolar desarrolle con normalidad las actividades en la escuela (Muñoz y Martí, 2008; Requejo y Ortega, 2015). La calidad nutricional del desayuno influye sobre el rendimiento intelectual y concentración de los niños, por lo que debe incluir leche o producto lácteo, un alimento a base de cereales y una fruta (Muñoz y Martí, 2008, López-Sobaler *et al.*, 2018). En el estudio de Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad (ALADINO) 2019 llevado a cabo con casi 17000 escolares españoles, solo el 2,2% realizó un desayuno de calidad incluyendo al menos los tres grupos de alimentos citados. El desayuno más frecuente fue un lácteo con bollería y/o galletas, con casi un tercio de los encuestados eligiendo esta opción y solo el 2,4% de los escolares declararon no haber desayunado el día del estudio (AECOSAN, 2020b). La relación de la omisión de desayuno con un peor rendimiento es una asociación extensamente estudiada (Ptomey *et al.*, 2016).

A media mañana, es conveniente reforzar la ingesta del desayuno con una fruta, yogur o bocadillo que aporte entre el 5 y el 10% de las necesidades energéticas diarias. Es importante evitar el consumo de bollería y chucherías.

A medio día se realiza la comida principal del día, por lo que tiene que ser lo más equilibrada posible y que proporcione entre el 30 y el 35% del aporte calórico diario. Esta comida estará compuesta por un primer plato, un segundo plato y postre.

La siguiente comida del día es la merienda, que tiene que cubrir entre el 10 y el 15% de la energía total diaria. Los mejores complementos nutricionales los aportan alimentos como los lácteos y frutas, y se debe evitar que sea abundante para que lleguen con apetito a la última comida del día.

La cena debe aportar entre el 25 y el 30% de los requerimientos energéticos del día, por lo que se complementará con la comida del mediodía realizada en casa o en la guardería, con el fin de no repetir los platos (Muñoz y Martí, 2008).



Figura 8. Nueva Pirámide de la Alimentación y la Actividad Física de la Estrategia NAOS (AESAN, 2010b)

### **2.2.6.3. Cantidades y raciones de alimentos: Pirámide de la alimentación saludable**

Como se ha visto con anterioridad, las Guías Alimentarias de la SENC y su pirámide nutricional (Figura 5) son la referencia a nivel nacional. Existen pirámides dirigidas a la población infantil como la elaborada también por la SENC (Figura 6), la pirámide para la población infantojuvenil de la AEP (Alonso y Castellano, 2007), la pirámide tridimensional del estilo de vida saludable para niños y adolescentes (González-Gross *et al.*, 2008) o la nueva pirámide de la alimentación y la actividad física (Figura 8), que fue publicada por el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad con la reedición de la Estrategia NAOS en 2010. La nueva pirámide muestra la frecuencia de consumo de los distintos grupos de alimentos y resalta el importante papel del ejercicio (juegos, paseo, subir escaleras, etc.) en la prevención de la obesidad (AESAN, 2010b).

Concretando el número de raciones de los distintos grupos de alimentos que aconsejan la mayoría de estas Guías alimentarias, las pautas recomendadas para escolares son:

- Lácteos: 2-3 raciones/día.
- Frutas, verduras y otras hortalizas: 5-7 raciones/día.
- Cereales y legumbres: 6-8 raciones/día.
- Carnes, pescados y huevos: 2-3 raciones/días.
- Dulces y grasas ocasionalmente.

También se debe tener en cuenta que para ajustar la ingestas deben hacerse recomendaciones acerca del tamaño de las raciones. Sirvan como ejemplo las recomendaciones proporcionadas por la Guía de comedores del Programa PERSEO (MISACO, 2008) y del DoCACE (MSPSI, 2010), que se detallan en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Recomendaciones del tamaño de las raciones de grupos de alimentos para población escolar (MISACO, 2008; MSPSI, 2010).

Alimento	PERSEO	Alimento	DoCACE
Verduras y otras hortalizas	80-150 g plato principal 20-40 g guarnición	Verduras	120-150 g plato principal 60-75 g guarnición
Patatas	80-150 g plato principal 20-38 g guarnición	Patatas	200-250 g plato principal 90-100 g guarnición
Pasta	40-70 g plato principal 10-18 g guarnición	Pasta, arroz	60-80 g plato principal 20-25g guarnición
Arroz	40-70 g plato principal 10-18 g guarnición		20-25 g sopa
Legumbres	35-50 g plato principal 9-12 g guarnición	Legumbres	60 g plato principal 30 g guarnición
Pan	25-50 g	Pan	60 g
Carne (sin hueso)	50-85 g	Carnes	80-90 g filete pequeño 100-120 g chuleta grande de cerdo/costillas de cordero
Carne (con hueso)	65-110 g		80-90 g carne picada (para albóndigas, hamburguesas) 20-30 g carne picada (para arroz, pasta) 150-160 g pollo guisado
			Derivados cárnicos 25-30 g embutido, fiambre
Pescado (limpio y sin espinas)	50-85 g	Pescado en filetes	100-120 g
Huevos	64 g	Huevos	1-2 unidades
Fruta	80-150 g	Fruta	150-200 g
Lácteos (leche)	100-200 g	Leche (postre)	200 ml
Yogur	125 g		
Queso	20-60 g	Queso	50-60 g

#### **2.2.6.4 Alimentación de niños de corta edad**

##### **2.2.6.4.1 Alimentación complementaria del niño de 6 a 12 meses**

La alimentación complementaria se refiere a todo alimento sólido o líquido que comienza a tomar el lactante, distinto de la leche materna o de un preparado para lactantes o de continuación (Cañedo-Argüelles *et al.*, 2019).

Tanto la ESPGHAN como la AEP consideran la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses como un objetivo deseable, pero a partir de los 6 meses

puede ser insuficiente energética y nutritivamente. Por ello, la alimentación complementaria puede proporcionar los nutrientes suficientes que ayuden al lactante al desarrollo madurativo y psicomotor, eviten déficits de micronutrientes y disminuyan el riesgo de desarrollar alergias alimentarias (Fewtrell *et al.*, 2017; Gómez, 2018).

No existen bases científicas sólidas para especificar cómo y cuándo introducir los diferentes grupos de alimentos y suele estar condicionado por la tradición cultural, situación económica o desarrollo del niño. Todas las recomendaciones indican que la alimentación complementaria se debería introducir alrededor de los 6 meses. No obstante, el Comité de la ESPGHAN recomienda entre la semana 17 y la 26, debido al riesgo de deficiencia de hierro de los lactantes y a que las funciones gastrointestinales y renales están suficientemente maduras sobre los 4 meses (Domellöf *et al.*, 2014).

La forma de comenzar con la alimentación complementaria es de manera individualizada, lenta, progresiva y en pequeñas cantidades para que el lactante vaya aceptando los nuevos alimentos y sus sabores (no añadir azúcar, ni sal, ni edulcorantes) y poder detectar la causa de una eventual reacción de hipersensibilidad alimentaria (Cañedo-Argüelles *et al.*, 2019).

El lactante es el que decide cuánta cantidad come y los padres deben respetar las señales de hambre y saciedad sin forzarle a comer o distraerle. La presentación empieza por purés progresando hacia texturas grumosas y semisólidas (pequeños trozos cortados o aplastados) nunca más tarde de los 8-9 meses, para que al año de edad consuma la misma dieta familiar (OMS, 2018b). El orden en el que se deben introducir los alimentos no está establecido, aunque se aconseja que los alimentos ricos en hierro se introduzcan en primer lugar (Fewtrell *et al.*, 2017). En la Tabla 13 se muestra una posible secuencia de introducción de alimentos.

**Tabla 13.** Calendario orientativo de incorporación de alimentos.

Alimentos	Edad de incorporación (meses) y duración aproximada			
	0-6	6-12	12-24	24-36
Leche materna				
Preparados para lactantes	De inicio	De continuación		
Cereales con o sin gluten, frutas y hortalizas, pescado, carnes, legumbres, huevo, aceite de oliva				
Yogur natural y queso fresco		>9 meses		
Leche entera de vaca				
Sólidos con riesgo de atragantamiento (frutos secos enteros, palomitas, granos de uva)				> 3 años
Alimentos superfluos o procesados (azúcar, miel, mermeladas, chocolate, bollería, y embutidos)	Cuanto más tarde y menos cantidad, mejor			
Sal y alimentos salados	Se recomienda evitar su uso			

Fuente: Elaboración propia adaptada de Manera y Salvador (2016).

Un aspecto de controversia en la introducción de alimentos es el referido a las bebidas. El agua debe ser la bebida de elección para calmar la sed, evitando el consumo de zumos de fruta antes del año de edad (en niños de 1 a 3 años se permite un máximo de 120 ml/día). Las bebidas de escaso valor nutritivo (té, infusiones, azucaradas y carbonatadas) se deben evitar. La leche de vaca se debe evitar también por su bajo contenido en hierro y por su contenido en proteínas que pueden ser alérgicas para el lactante. Podrá tomar pequeñas cantidades antes de los 12 meses, pudiendo consumir leche entera a partir de esa edad (Fewtrell *et al.*, 2017).

En los últimos años, a raíz de cuestionar la necesidad de triturados para iniciar la alimentación complementaria, ha surgido el concepto de la alimentación dirigida por el lactante (BLW, *Baby-Led-Weaning*), que es una forma de alimentación complementaria en la que el lactante dirige el proceso desde el principio. Los padres seleccionan qué alimentos sólidos ofrecerle y el niño decide qué elegir y cuánta cantidad. La práctica se fundamenta en que el bebé se sienta con la familia en la mesa y el niño se alimenta por sí solo, con los dedos al comienzo y con los cubiertos posteriormente. El aporte de leche materna o artificial será a demanda sin relación con la comida familiar (Rapley, 2011).

En 2015, se presentó una versión modificada de la BLW, llamada introducción de sólidos guiada por el bebé (BLISS, *Baby-Led-Introduction to Solids*),

para abordar las principales preocupaciones generadas en la BLW. La BLISS se caracteriza por ofrecer alimentos que el niño sea capaz de coger con sus manos y dirigir a la boca (sin riesgo de asfixia), ofrecer un alimento en alto contenido en hierro y un alimento de alto valor energético en cada comida (Daniels *et al.*, 2015).

En la Tabla 14 se muestra la frecuencia de consumo para cada grupo de alimentos y actividad física en lactantes (6-12 meses), recomendada por la Consejería de Sanidad de Madrid (BOCM, 2018a).

**Tabla 14.** Frecuencia recomendada de consumo para cada grupo de alimentos y actividad física en lactantes (6-12 meses) (BOCM, 2018a).

Grupos de alimentos	Frecuencia recomendada	Peso de cada ración (en crudo y neto)	Medidas caseras 1 plato normal
Frutas	1-2	100 g	1 pieza pequeña ½ taza de cerezas-fresas
Verduras	2-4	80 g	¼ plato verdura cocida
Lácteos	3-4	Leche materna Fórmula: 150-180 ml	1 biberón de leche ½ unidades de yogur
Aceite de oliva	1-2	5 g	1 cuchara de postre
Pan y cereales	2-3	20-30 g de pan 20-30 g cereales	2-3 dedos de una barra de pan 4-6 cucharadas soperas 4-6 galletas
Pasta, arroz, maíz, patata	1-2	30-40 g en crudo 75-100 g en cocido 50-60 g patata	3 cucharadas soperas de arroz o pasta (secas) 4 cucharadas soperas de macarrones (secas) ½ patata mediana
Legumbres	1-2	30-40 g seco 75-100 g cocido	3 cucharadas soperas, cocinadas y secas
Pescado	2-3	50-60 g	1 filete pequeño 1 lomo merluza de 2 dedos de grosor
Carnes magras, aves	3	30-50 g	1 filete pequeño 1 muslo pollo
Huevos	1	60-75 g	1 huevo
Actividad física	Diario	Varias veces al día en entornos seguros	Juegos en el suelo Actividades supervisadas en el agua

En la Tabla 15 se propone un menú diario para niños de aproximadamente 8 meses y de 10-12 meses, propuesto por la Agencia de Salud Pública de Cataluña (Manera y Salvador, 2016).

**Tabla 15.** Ejemplo de menú diario para niños menores de 8 a 12 meses (Manera y Salvador, 2016).

	<b>Niños 8 meses</b>	<b>Niños 10-12 meses</b>
Desayuno	Papillas de cereales o un trozo de pan con aceite	Pan con tomate y aceite y queso tierno
Comida	Verduras con patata y trocitos de pollo	Judía tierna, zanahoria, patata y cebolla y filete de merluza cortado en trocitos. Naranja
Merienda	Pera	Plátano, un yogur natural y un palito de pan
Cena	Arroz con zanahoria y guisantes	Sopa de arroz, calabaza y garbanzos
	Leche materna a demanda (o, si no es posible, leche adaptada)	

#### **2.2.6.4.2 Menú diario más adecuado para niños de 1 a 3 años**

Las recomendaciones específicas de ingesta por grupos de alimentos y su frecuencia de consumo ya se han detallado anteriormente en el punto 2.26.3. A modo de síntesis, la Tabla 16 recoge la frecuencia de cada grupo y el peso de cada ración y su correspondiente medida (BOCM, 2018b).

**Tabla 16.** Frecuencia recomendada de consumo para cada grupo de alimentos y actividades física en preescolares (1-3 años) (BOCM, 2018b).

Grupos de alimentos	Frecuencia recomendada	Peso de cada ración (en crudo y neto)	Medidas caseras 1 plato normal
Frutas	2-3	100 g	1 pieza pequeña 3 fresones/5 fresas medianas ½ rodaja de melón
Verduras	2-3	100-150 g plato principal 50 g guarnición	¼ plato verdura cocida ½ plato de lechuga 1 zanahoria
Lácteos	3-4	125-150 ml de leche 125 g de yogur 40 g de queso fresco	½ vaso grande de leche entera 1 unidad de yogur ½ quesito
Aceite de oliva	2-3	5 g	1 cucharada de postre
Pan y cereales	2-3	30 g de pan 20 g cereales desayuno 20 g galletas "maría"	2-3 dedos de una barra de pan 2 cucharadas soperas 3 galletas
Pasta, arroz, maíz, patata	4	50 g arroz (crudo) 60 g pasta (crudo) 100 g pasta	1 plato de postre ó 1 cucharón (cocido) 1 patata mediana
Legumbres	2	40-50 g crudo	1 cazo de servir (cocido) o ½ plato hondo raso
Pescado	3-4	50 g	1 filete pequeño 1 lomo merluza de 2 dedos de grosor
Carnes magras, aves	3-4	50 g	1 filete pequeño tipo cinta de lomo 1 muslo pollo ½ filete pequeño de ternera
Huevos		2-3 50 g	1 huevo S
Embutidos y carnes grasas, bollería, helados			Ocasionalmente
Agua	4-5	200 cc	1 vaso
Actividad física	Diario	2 horas al día	Actividades infantiles habituales en niños sanos

Como también se ha comentado, el patrón de distribución de comidas diario de un niño en edad preescolar, tiene que estar compuesto por 4 ó 5 comidas y cada una con su correspondiente contribución calórica.

Las dos comidas principales se repartirán en dos platos y un postre. El primer plato está basado en arroz, pasta, verduras con patata, menestra de verduras o legumbres con verduras en puré. Este primer plato aporta una importante contribución energética en forma de hidratos de carbono complejos, por lo que es importante su ingesta para no tener que cubrir las necesidades energéticas con las proteínas del segundo plato.

El segundo plato está compuesto por una fuente proteica (carnes, derivados cárnicos, pescado o huevos), que además son ricos en otros micronutrientes como el hierro. Es conveniente acompañar al segundo plato de una guarnición de ensalada, verduras o patatas (asadas, cocidas o en puré).

Para el postre lo más aconsejable es una pieza de fruta. Si se alterna con algún producto lácteo, hay que garantizar el aporte de fruta en la merienda y a media mañana. Se tiene que evitar la bollería u otros platos dulces.

La bebida será agua y el pan blanco, que se podrá cambiar un día a la semana por pan integral (Leis *et al.*, 2007; Aranceta *et al.*, 2008).

En la Tabla 17 se propone un menú diario para niños de 1 a 3 años propuesto por la Agencia de Salud Pública de Cataluña (Manera y Salvador, 2016).

**Tabla 17.** Ejemplo de menú diario para niños de 1 a 3 años (Manera y Salvador, 2016).

	Niños 12-18 meses	Niños 18-36 meses
Desayuno	1 taza de leche y pan tostado con aceite con un trozo de queso tierno	Leche y tostadas con aceite y un trozo de queso tierno
Media mañana	Gajos de naranja o mandarina	Plátano
Comida	Judía verde y patata con huevo duro. Macedonia	Guiso de patatas, zanahoria, calabacín, guisantes y dados de pollo. Fresas
Merienda <sup>1</sup>	1 yogur natural y tortitas de maíz	1 Yogur natural con muesli
Cena	Sopa de pistones, filete de lenguado al horno y zanahoria rallada. Fresas	Caldo vegetal con fideos y filete de merluza con verduras en papillote. Pera
Leche materna a demanda		

<sup>1</sup> En caso de que se incluya un alimento proteico, como por ejemplo el jamón en la merienda, habrá que reducir la cantidad de carne, pescado y huevo que se sirva en la comida y/o cena.

### 2.2.6.5. El comedor escolar

Las nuevas realidades sociales (incorporación de la mujer al mundo laboral, familias monoparentales, grandes distancias entre el hogar y escuela, etc.), han ocasionado que numerosas familias tengan que recurrir a CEI y sus comedores escolares (Aranceta y Pérez, 2015).

Los últimos datos estadísticos publicados por el MEFP referentes al curso escolar 2017-2018, indican que el 64,3% de los CEI públicos y el 75,5% de los privados disponen de comedor escolar (MEFP, 2020). Como se puede apreciar en estos datos estadísticos, la oferta del comedor escolar en España ha aumentado en los últimos años. Para su gestión se dispone de diferentes modelos. Se puede cocinar la comida en el centro o elaborarla en una cocina central para su distribución en línea caliente o línea fría. Respecto al menú, puede ser único o de elección, pero en ambos casos deberán disponer de menús especiales o alternativos para alérgicos e intolerantes y de menús adaptados para dieta blanda (Cuadrado *et al.*, 2015).

El comedor escolar es un instrumento de educación nutricional que ayuda a la incorporación de nuevos gustos, hábitos alimentarios y normas para una óptima alimentación y nutrición que acompañarán al niño durante toda su vida. Además, en sus instalaciones se realiza la principal comida del día, por lo que su papel es muy importante desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo. Esta situación supone la contribución a la energía total del 30-35% durante cinco días a la semana en torno a diez meses al año (Aranceta *et al.*, 2008).

Así, el comedor escolar ofrece una excelente oportunidad para poner en práctica lo aprendido en el aula y ampliar el repertorio de alimentos introducidos con una presentación y textura diferentes, que favorezca la aceptación de nuevos platos y tomar una dieta más variada. El estudio *Dime cómo comes* también evaluó otros aspectos importantes para poder ofertar un servicio de calidad, como son la calidad percibida del servicio e instalaciones (Aranceta *et al.*, 2004).

Por tanto, el comedor escolar desempeña una función alimentaria con el suministro de alimentos y composición de los menús ofertados; una función nutricional que satisface las necesidades alimentarias de los preescolares; y una función socializadora, cultural y educativa que favorece el desarrollo y promoción de la salud (Aranceta y Pérez, 2015).

#### **2.2.6.6. Cómo debe ser un buen menú escolar**

Los niños que asisten a la escuela infantil son un grupo muy heterogéneo que requieren unas necesidades nutricionales muy distintas entre ellos. El diseño de los menús escolares tiene que tener en cuenta las preferencias alimentarias y las características de los comensales y deberían invitar a familiarizarse con nuevos sabores y texturas (Aranceta *et al.*, 2008). Por ello, para que los menús servidos en estos centros sean saludables y aceptados, se deberán tener en cuenta en su elaboración las siguientes premisas (Leis *et al.*, 2007; MISACO, 2008):

- Ajustar el contenido energético del menú a las necesidades de energía de los niños en función de su edad, sexo y actividad física.
- Realizar menús con un aporte calórico adecuado a los distintos macronutrientes, con predominio de los hidratos de carbono en detrimento de un

menú hiperproteico o hipercalórico, y con un contenido en micronutrientes suficiente.

- Ajustar la frecuencia de los distintos grupos de alimentos y la variedad de alimentos dentro de cada grupo.
- Preparar y elaborar los menús de manera que no alteren el valor nutricional de los alimentos, y usar técnicas culinarias y recetas variadas para educar el sentido del gusto y aceptación por los niños.
- Evitar el consumo de productos precocinados y frituras.
- Adecuar el tamaño de las raciones e ingredientes para que el preescolar pueda consumir el total del menú.
- Evitar caer en la monotonía e intentar no repetir el mismo menú hasta pasados al menos 15 días. También se debe variar el menú según la estación del año.
- Ofertar agua y pan durante toda la comida.
- Limitar el contenido de sal.
- Desde el punto de vista de seguridad alimentaria, aparte de usar materias primas de calidad, se mantendrá una correcta higiene y buenas prácticas de manipulación.
- Ofrecer menús alternativos para los niños con problemas de salud o facilitar los medios de conservación y calentamiento para las comidas preparadas en su casa.

Las Tablas 18 y 19 muestran unos menús escolares orientativos para lactantes y niños de entre 1 y 3 años, respectivamente.

**Tabla 18.** Ejemplo de menú de comida escolar semanal para lactantes (6-12 meses) (BOCM, 2018a).

	Lunes	Martes <sup>3</sup>	Miércoles	Jueves <sup>4</sup>	Viernes
Comida	Puré de verduras <sup>1</sup> con ternera magra	Puré de verduras <sup>2</sup> con pescado blanco	Puré de verduras <sup>1</sup> con huevo	Puré de verduras <sup>2</sup> y legumbres	Puré de verduras <sup>1</sup> con pollo
Complemento	Lactancia materna, lactancia artificial o lácteo				

<sup>1</sup> Puré de verduras: Base de zanahoria y patata junto a tres verduras de temporada.

<sup>2</sup> Puré de verduras: Base de arroz y zanahoria junto a tres verduras de temporada.

<sup>3</sup> El menú del martes se podría repetir el sábado en casa.

<sup>4</sup> El menú del jueves se podría repetir el domingo en casa.

**Tabla 19.** Ejemplo de programación semanal de menús escolares para preescolares (1-3 años) (BOCM, 2018b).

	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
<b>Primer plato</b>	Sopa de arroz con verduras	Lentejas con arroz	Judías verdes rehogadas en salsa de tomate	Sopa de cocido con fideos	Macarrones con queso
<b>Segundo plato</b>	Tortilla de patatas con rodajas de tomate	Menestra de verduras	Hamburguesa de ternera con patatas	Cocido completo	Lenguado al horno con calabacín
<b>Postre</b>	Fruta	Macedonia	Zumo de naranja natural	Fruta	Plátano y naranja con rodajas
<b>Pan blanco<sup>1</sup></b>			1 ración (30 g)		

<sup>1</sup> En ocasiones, ofrecer pan integral en lugar de pan blanco.

### 2.2.6.7. Políticas de salud pública infantil

En la actualidad, las orientaciones en relación con las prácticas alimentarias y la actividad física saludable constituyen elementos esenciales en todas las estrategias de promoción de la salud y prevención de las enfermedades crónicas.

#### 2.2.6.7.1 Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud

La OMS considera la obesidad infantil uno de los problemas de salud pública más graves del siglo XXI. Para hacer frente a esta epidemia, en 2004 elaboró una estrategia, cuya meta general era promover y proteger la salud orientando la creación de un entorno favorable para la adopción de medidas sostenibles a escala individual, comunitaria, nacional y mundial que, en conjunto, dieran lugar a una reducción de la morbilidad y mortalidad asociadas a una alimentación poco sana y a la falta de actividad física. En el punto 43 de dicha estrategia, se animaba a los Gobiernos a formular y adoptar políticas que apoyaran dietas saludables en el colegio y limitaran la disponibilidad de productos con un alto contenido en sal, azúcares y grasas. También se alentó a los centros educativos, junto a las familias, a contratar el suministro de proveedores locales (OMS, 2004).

En 2013, en reconocimiento a la importancia de la dieta como determinante de la salud, la OMS impulsó el Plan de Acción Global para el Control de Enfermedades No Transmisibles, que incluye estrategias dirigidas a las dietas no saludables, inactividad física, abuso de tabaco y bebidas alcohólicas. Los cambios relacionados con la dieta se refieren al balance de la ingesta energética, a la limitación de AGS y AG *trans* en beneficio de los AGI, al aumento del consumo de frutas y verduras, y a la limitación de sal y azúcar (OMS, 2013).

#### **2.2.6.7.2** Libro blanco de la UE para una estrategia europea sobre problemas de salud relacionados con la alimentación, el sobrepeso y la obesidad

La CE, en consonancia con la estrategia de la OMS, elaboró el Libro Blanco de la UE para una estrategia europea sobre problemas de salud relacionados con la alimentación, el sobrepeso y la obesidad. En este documento se alude a la infancia como un período determinante para inculcar comportamientos saludables y conocimientos para adoptar un estilo de vida saludable, y a la escuela como el escenario de intervención donde desarrollar acciones eficaces para modificar los comportamientos a largo plazo (UE, 2007).

Posteriormente, la UE estableció sus líneas de acción con el Plan de Acción de la UE 2014-2020 sobre obesidad infantil, que enfatiza la importancia del entorno escolar para la promoción de la salud infantil (UE, 2014).

#### **2.2.6.7.3** Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad (NAOS)

En este contexto, el MISACO, a través de la AESAN, afrontó y lideró la situación de la obesidad en nuestro país con el diseño de la Estrategia NAOS, que tiene como finalidad mejorar los hábitos alimentarios e impulsar la práctica regular de la actividad física de todos los ciudadanos, poniendo especial atención en la prevención de la obesidad durante la etapa infantil (AESAN, 2005a). Desde su lanzamiento en el año 2005, el objetivo de la Estrategia NAOS es invertir la tendencia de la obesidad mediante acciones o intervenciones en distintos ámbitos de la sociedad (familiar, educativo, empresarial, sanitario, laboral, comunitario) que promuevan y faciliten opciones para una alimentación variada y equilibrada, y para la práctica de actividad física, así como una información más adecuada para ayudar al consumidor a elegir los alimentos más saludables.

En 2008 se creó una Comisión para la Estrategia NAOS en la que trabajan coordinadamente las Consejerías de Sanidad de las CC. AA. y el Ministerio de Agricultura y de Educación. Esta Comisión desarrolla programas de promoción de la alimentación, de nutrición, o de actividad física para la prevención de la obesidad y/o el fomento de hábitos saludables. Algunos de los proyectos más importantes que se han realizado bajo su amparo han sido los estudios ALADINO en 2011, 2013, 2015 y 2019, o la elaboración del DoCACE en 2010, que establece criterios nutricionales que deben cumplir los alimentos y bebidas ofertados en los centros educativos, así como las frecuencias de consumo recomendadas de cada alimento en los menús escolares.

Otras iniciativas merecedoras de mención durante los años de aplicación de la Estrategia NAOS son el Código PAOS de correulación de la publicidad de alimentos y bebidas dirigida a menores, prevención de la obesidad y salud, la Pirámide NAOS, y numerosas campañas de promoción y educación, o publicaciones (Libro Blanco de la Nutrición en España, Libro Blanco de Nutrición Infantil en España, entre otros documentos).

#### **2.2.6.7.4 Programa Piloto Escolar de Referencia para la Salud y el Ejercicio contra la Obesidad (PERSEO)**

Los preocupantes datos obtenidos a través de la Encuesta Nacional de Salud de España en 2006, relativos a la prevalencia de obesidad y sobrepeso en la infancia, revelaron que un 15,38% de los niños de entre 5 y 9 años presentaban obesidad y un 21,43% sobrepeso (MISACO, 2006). Ello hizo que en ese mismo año la AESAN, en el marco de la Estrategia NAOS, promoviera el Programa Piloto Escolar de Referencia para la Salud y el Ejercicio contra la Obesidad (PERSEO), orientado a la promoción de la alimentación y la actividad física saludable en el ámbito escolar. Consiste en un conjunto de intervenciones sencillas en los centros escolares que pretenden promover hábitos de vida saludables entre los alumnos (6-10 años), actuando simultáneamente sobre el comedor y el entorno escolar para facilitar la elección de las opciones más sanas e implicando también a las familias. Se trata de un programa institucional y necesita de la participación de las distintas Administraciones públicas.

El programa empezó con una experiencia piloto en las 6 CC. AA. que presentaban mayor prevalencia en obesidad más las dos ciudades autónomas, con el objeto de que en el futuro sirviera de modelo para su implementación a nivel estatal. Uno de los objetivos consistió en identificar los factores determinantes del patrón de consumo alimentario, para lo que se realizó un ensayo de intervención comunitaria centrado en el medio escolar. Para ello, se dirigió el programa didáctico y de formación al profesorado, familias, personal de los centros educativos y personal de las administraciones (Aranceta *et al.*, 2013a).

#### **2.2.6.7.5 Ley 17/2011 de seguridad alimentaria y nutrición**

La Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición abordó la materia de nutrición, íntimamente relacionada con la salud asociada a una correcta alimentación. El capítulo VII está dedicado a la alimentación saludable, la actividad física y la prevención de la obesidad como respuesta a la creciente preocupación de las autoridades sanitarias nacionales e internacionales por la ascendente prevalencia de obesidad. Con la entrada en vigor de la ley, se dio respaldo legal a la Estrategia NAOS estableciendo varias líneas de acción ya iniciadas e impulsando otras.

Así, la ley articuló la creación del Observatorio de la Nutrición y del Estudio de la Obesidad con el fin de obtener la adecuada evidencia sobre la situación existente de la obesidad en España y de sus factores determinantes. También contempla medidas especiales dirigidas a menores, particularmente en el ámbito escolar, como actividades de enseñanza de la nutrición para los alumnos y formativas del profesorado, supervisión por profesionales con formación acreditada del correcto equilibrio nutricional y variedad de las comidas servidas en los centros educativos. Además, las escuelas infantiles y los centros escolares tienen que proporcionar la programación mensual de los menús (incluidos aquellos con necesidades especiales), con detalle de los productos

utilizados para que la cena sea complementaria con el menú del mediodía. También considera estos centros espacios protegidos de la publicidad y no permite la venta de alimentos y bebidas con un alto contenido en AGS, AG *trans*, sal y azúcares.

Por último, la ley insta al Gobierno, en coordinación con las CC. AA., la administración local y con la participación de los operadores económicos y los agentes sociales, a desarrollar la Estrategia NAOS. A raíz de esta estrategia, y dentro del Programa PERSEO, se elaboró en el año 2008 la Guía de Comedores Escolares (MISACO, 2008) o el ya citado DoCACE (MSPSI, 2010) a nivel nacional.

En el ámbito autonómico, las 17 CC. AA. y la ciudad autónoma de Ceuta disponen de 38 planes y programas relacionados con las políticas alimentarias, que incluyen 18 planes de salud, 14 programas nutricionales integrales y 6 programas de obesidad infanto-juvenil (Sánchez *et al.*, 2019). Además, las 17 CC. AA. cuentan con sus correspondientes guías que toman como referencia el DoCACE para la composición de los menús en las escuelas, 11 comunidades abordan los servicios de cafetería y las máquinas expendedoras y 9 el servicio de desayuno, aunque solo 4 CC. AA. han regulado legalmente estos aspectos (Monroy-Parada *et al.*, 2019).

En la Tabla 20 se recogen las Guías Prácticas específicas para la etapa preescolar o que, al menos, incluyen el grupo de edad hasta los 3 años, elaboradas por algunas comunidades autónomas.

**Tabla 20.** Guías Prácticas para centros de educación infantil.

CC. AA.	Guía /Recomendaciones
<b>Andalucía</b>	Guía para la promoción de la alimentación equilibrada en niños y niñas menores de tres años (2005)
<b>Asturias</b>	Comer en la escuela infantil. Recomendaciones de 0 a 3 años (2011)
<b>Canarias</b>	Guía pediátrica para la alimentación. Pautas de alimentación y actividad física de 0 a 18 años (2011)
<b>Cantabria</b>	Programa alimentación saludable y actividad física en la infancia y adolescencia (2010)
<b>Castilla-La Mancha</b>	Guía de Alimentación para comedores escolares (2006)
<b>Cataluña</b>	Recomendaciones para la alimentación en la primera infancia (de 0 a 3 años) (2016)
<b>Madrid</b>	Guía Práctica para la planificación del menú de comedor escolar (2008)
<b>Madrid</b>	Recomendaciones dietético-nutricionales. Preescolares (1-3 años) (2018)

La realización de estudios o encuestas nacionales y autonómicas sobre la organización y gestión del comedor escolar, oferta de alimentos y perfil nutricional de los menús servidos, puede aportar una información valiosa para el desarrollo de guías dietéticas o políticas nutricionales. Entre ellos destacan los estudios enKid (Serra-Majem *et al.*, 2006), ENRICA (Guallar-Castillón, 2013), ALADINO (AESAN, 2020b), ALSALMA (Dalmau *et al.*, 2015), ANIBES

(Pérez-Rodrigo *et al.*, 2016), ENALIA (López-Sobaler *et al.*, 2017), ELOIN (Ortiz-Marrón *et al.*, 2018), ENPE (Aranceta-Bartrina *et al.*, 2020) y EsNuPI (Madrigrál *et al.*, 2020; Cuadrado-Soto *et al.*, 2020), entre otros.

#### 2.2.6.7.6 Plan de colaboración para la mejora de la composición de los alimentos y bebidas y otras medidas 2017-2020

Por otra parte, la AESAN, a través de la Estrategia NAOS, forma parte del Grupo de Alto Nivel para la Nutrición y Actividad Física de la CE, que en 2008 acordó el abordaje prioritario de la reformulación de los alimentos y bebidas para conseguir una dieta con mejor calidad nutricional.

El MSCBS, a través de la AESAN, junto a varios sectores de la alimentación, promovieron un plan para la mejora de la composición de varios tipos de alimentos y bebidas. En concreto, las empresas firmantes confirmaron la voluntad de reducir azúcares añadidos, sal y grasas saturadas en los aperitivos salados, las bebidas refrescantes, bollería y pastelería, cereales de desayuno infantil, cremas de verduras, derivados cárnicos, galletas, helados, néctares de frutas, pan envasado, platos preparados, productos lácteos, salsas y tomate frito con el objetivo de ayudar a los consumidores a prevenir la obesidad y las enfermedades relacionadas (cardiovasculares, diabetes, etc.) (Resolución de 8 de febrero de 2019).

Por último, es interesante citar una publicación que pretende crear entornos alimentarios saludables para revertir la epidemia de la obesidad y las principales ENT en España: “querer es poder”, cuyas políticas alimentarias se recogen en la Tabla 21.

**Tabla 21.** El PODER de las políticas alimentaria (Royo-Bordonada *et al.*, 2019).

Pilar	Área de intervención	Política prioritaria
Entorno alimentario	<b>P</b> Publicidad alimentaria dirigida a menores	Regulación integral de la publicidad alimentaria dirigida a menores
	<b>O</b> Oferta de alimentos y bebidas	Promover una oferta saludable en máquinas expendedoras de alimentos y bebidas
	<b>D</b> Demanda de alimentos y bebidas	Impuesto a las bebidas azucaradas
	<b>E</b> Etiquetado frontal interpretativo	Aplicación efectiva del <i>Nutri-Score</i>
	<b>R</b> Reformulación de productos procesados	Reformular los acuerdos de reformulación con la industria

#### 2.2.7 Factores de riesgo nutricional

Los cambios de estilos de vida acontecidos en los últimos años han modificado la alimentación de los niños, lo que condiciona el consumo de alimentos con elevado aporte calórico y baja calidad nutricional. Los hábitos alimentarios inadecuados que se generan podrían jugar un papel fundamental en la alta

prevalencia de las denominadas enfermedades de la civilización, entre las que destaca la obesidad.

A continuación se presentan los principales riesgos nutricionales que pueden presentarse en la dieta infantil.

#### **2.2.7.1 Ingesta excesiva de alimentos proteicos**

Hay evidencia de que una ingesta elevada de proteína durante los dos primeros años de vida aumenta el riesgo de padecer obesidad a lo largo de la vida, gota y otras ENT, pudiendo tener también consecuencias sobre la funcionalidad de los riñones. Se piensa que la ingesta proteica estimula la secreción del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), que provoca la proliferación celular, acelera el crecimiento y aumenta el tejido adiposo. La concentración IGF-I se asocia más a las propiedades de la proteína de leche de vaca que a las de la carne, cuyo consumo, por otra parte, es menor en estas edades. Por ello, parece prudente limitar el contenido de proteína en fórmulas infantiles utilizadas en el primer año de vida y reducir el consumo de leche de vaca durante el segundo año de vida (Michaelsen *et al.*, 2012; Michaelsen *et al.*, 2014).

El estudio nacional ALSALMA puso de manifiesto el elevado consumo de proteínas en la dieta de los niños menores de 3 años, con un 95,9% de niños que consumió más del doble de proteínas recomendadas. Sin embargo, el perfil calórico de las proteínas no superó el 20% del total (Dalmau *et al.*, 2015). Por lo tanto, hay que ajustar la cantidad de suministro de los alimentos proteicos de origen animal (carne, pescado, huevos y lácteos).

#### **2.2.7.2 Ingesta excesiva de grasas saturadas y ácidos grasos trans**

Se ha demostrado la asociación entre la ingesta de AGS (carnes rojas, embutidos, alimentos ultraprocesados) y el aumento de las concentraciones de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y cociente colesterol total/colesterol HDL, considerado como un buen indicador de riesgo de enfermedad coronaria (Ros *et al.*, 2015).

Los AG *trans* provenientes de la hidrogenación de grasas vegetales (margarinas) y presentes en muchos alimentos (comidas rápidas, bollería industrial, aperitivos, etc.) producen efectos adversos en la salud debido a los cambios que producen en el perfil de las lipoproteínas séricas y también en la respuesta inflamatoria y la función endotelial, asociándose principalmente a enfermedades cardiovasculares (Riobó y Bretón, 2013).

Las políticas de reducción de consumo de AG *trans* y la implicación de la industria alimentaria en la reformulación de sus productos son la causa de la disminución del contenido de AG *trans* en los alimentos. La Ley 17/2011 estableció limitaciones y, recientemente, la UE ha regulado la presencia de grasas *trans* que no sean las presentes de forma natural en las grasas de origen animal, estableciendo un límite de 2 g por cada 100 g de grasa (Reglamento (UE) 2019/649).

Distintos trabajos sugieren que la sustitución de AGS y AG *trans* por AGPI y AGMI reduce el riesgo de enfermedad coronaria y diabetes tipo 2. Además, no hay datos suficientes que relacionen los AGMI con enfermedades crónicas, cáncer o ganancia de peso corporal (Risèrus, 2009; Mozaffarian *et al.*, 2010; y Ros *et al.*, 2014).

### **2.2.7.3 Ingesta excesiva de azúcares simples**

El consumo de azúcares libres ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. Ello no solo favorece el exceso de peso, sino que también predispone tanto en la infancia como en edad adulta al desarrollo de enfermedades como la diabetes tipo 2, hipertensión, dislipidemia y la aparición de caries (Te Morenga *et al.*, 2013).

Los carbohidratos son los componentes que directamente incrementan la glucosa en sangre y, por tanto, la secreción de insulina. El tipo de carbohidrato es más importante que la cantidad para determinar el riesgo de enfermedad crónica. Los granos de cereales refinados, patatas y bebidas azucaradas están asociados con un mayor riesgo y los granos mínimamente procesados, legumbres y frutas con un menor riesgo (Ley *et al.*, 2014). En función del índice glucémico de los carbohidratos del alimento consumido, afecta en mayor o menor medida a la hiperglucemia postprandial y a la hiperinsulinemia y, por consiguiente, determinará el desarrollo de diabetes tipo 2, enfermedad coronaria y obesidad (Ludwig *et al.*, 2002).

El mecanismo relacionado con la ganancia de peso está en continuo debate y parece ser la fructosa quien desempeña un papel importante. La fructosa se metaboliza en intestino e hígado y bajo ciertas condiciones experimentales puede estimular la lipogénesis de novo, la inflamación y la resistencia a la insulina (Goran *et al.*, 2013; Ludwig *et al.*, 2018). Ante esa situación la OMS recomienda limitar la ingesta de azúcares libres (azúcares añadidos, azúcares presentes de forma natural en zumos de fruta y concentrados de zumos de fruta), hasta no más del 10% de la energía total para prevenir la obesidad y las ENT, incluso una reducción inferior al 5% sería beneficiosa en relación con la caries dental (OMS, 2015).

La SENC (2011) plantea no superar el 10% de la energía a partir de azúcares añadidos, en especial en la población infantil. Se recomienda que los niños consuman menos de 25 g/día de azúcares añadidos (100 kcal/día o 6 cucharaditas) y evitar los azúcares añadidos para los niños menores de 2 años (Vos *et al.*, 2017; Fidler *et al.*, 2017).

En el estudio de Jardí *et al.* (2018) para relacionar el exceso de azúcares libres en la dieta de niños de 12 meses y el exceso de peso a los 30 meses, se observó que un elevado porcentaje de lactantes realizaban un consumo de azúcares libres mayor al 10% recomendado por la OMS y la SENC. El 31,2% de los niños de 12 meses presentaron un exceso de peso y a los 30 meses aumentó el porcentaje hasta el 39,5%. De hecho, muchos de los alimentos

dirigidos a lactantes que se introducen en la dieta en edad muy temprana son ricos en azúcares libres y añadidos, lo que supone un riesgo para desarrollar obesidad en una etapa posterior (Foterek *et al.*, 2016). La mayoría de los alimentos infantiles presentan un perfil nutricional inadecuado y superan ampliamente el contenido en azúcares (Elliot y Conlon, 2015).

En cuanto a las bebidas azucaradas, diferentes revisiones sistemáticas indican la asociación positiva entre su consumo y la ganancia de peso en niños y adultos debido a su alto contenido en azúcares añadidos, baja saciedad y la incompleta compensación calórica en las comidas ingeridas posteriormente (Malik *et al.*, 2013; Luger *et al.*, 2017). Por último, existe discrepancia en si incluir o no a los zumos de fruta en la definición de azúcares libres. Hay evidencias de que los zumos de fruta naturales favorecen un menor grado de compensación energética que la fruta, promoviendo un exceso de energía y una baja ingesta de fibra (Ferreira-Pêgo *et al.*, 2016).

#### **2.2.7.4 Aporte excesivo de sal**

Los niños, aparte de sentir atracción por el dulce, también tienen una especial preferencia por los alimentos con sabor salado, por lo que son vulnerables a un entorno en el que predomina la venta de alimentos con alto contenido en sodio. Se ha constatado que tanto la biología del lactante como las experiencias aprendidas influyen en el gusto de los niños hacia alimentos salados (Liem, 2017).

La mayor parte de la sal consumida en España procede de alimentos procesados y consumidos fuera del hogar, lo que se conoce como sal “oculta”. El estudio ENRICA indicó que las principales fuentes de sal en la dieta nacional son los productos de panadería (33,6%), los embutidos (21%) y los quesos (5,83%) (Guallar-Castillón, 2013). Las principales fuentes de sodio en el estudio ANIBES fueron las carnes y derivados (27%), cereales (26%), leche y derivados lácteos (14%) y comidas listas para el consumo (13%) (Partearroyo *et al.*, 2019). Al pan se le achaca la quinta parte de la ingesta total de sodio. Estos mismos alimentos son los responsables de la ingesta de sodio en los niños.

Las evidencias científicas relacionan el consumo de productos salados con un incremento de la hipertensión y, por tanto, con el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y accidente cerebrovascular (OMS, 2003). Zaragoza-Martí y Contreras (2020) han revisado la influencia de la ingesta de alimentos en la aparición o protección de diversos tipos de cáncer. De los 15 estudios referidos a la sal y su asociación con el cáncer de estómago, 10 reportaron asociación positiva, 2 solo encontraron diferencias estadísticamente significativas en hombres pero no en mujeres, y dos no encontraron asociación estadísticamente significativa. Un único estudio halló una acción protectora entre la ingesta de productos sin sal y la probabilidad de desarrollo de cáncer de estómago.

El exceso de sodio afecta desde edades tempranas a la salud. Se ha observado una estrecha relación entre el sodio urinario y el aumento de presión arterial (He y McGregor, 2006). El exceso de sodio también podría tener un papel importante en el aumento de prevalencia de sobrepeso y obesidad infantil (Libuda *et al.*, 2012; Moosavian *et al.*, 2017). Respecto a las enfermedades cardiovasculares (accidente cerebrovascular, enfermedades coronarias, aterosclerosis) es difícil establecer la relación con la excesiva ingesta de sodio en la población pediátrica. Sin embargo, la exposición a factores protectores o de riesgo según el estilo de vida en edades tempranas, determina la aparición de enfermedades cardiovasculares en el futuro. Por lo que la hipertensión, obesidad o diabetes son indicadores de riesgo cardiovascular al asociarse con enfermedad cardiovascular subclínica en la infancia (Alegría *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2015).

Las IR diarias establecidas por la AEP son de 2 g de sal al día (0,8 g de sodio) para los niños de 1 a 3 años y de 2 g de sal al día (menos de 0,4 g de sodio) hasta los 12 meses (Gómez *et al.*, 2018). Estas recomendaciones están en consonancia con las de la FESNAD, de 0,37 g de sodio entre los 7 y 12 meses, y de 1 g entre 1 y 3 años de edad (Cuervo *et al.*, 2010).

Los datos del estudio ENALIA sobre una muestra representativa de niños españoles entre 6 meses y 17 años, indican que un porcentaje alto de niños sobrepasan la ingesta máxima de sodio recomendada. Los grupos de edad de 6-12 meses y 1-3 años no superan los UL, pero sí el valor recomendado de IA (López-Sobaler *et al.*, 2017). En el estudio de ANIBES también ha puesto de manifiesto que la población española excede las recomendaciones de ingesta de sodio, especialmente en el grupo de adolescentes (13-17 años) y en el de niños (9-12 años) (Partearroyo *et al.*, 2019).

### **2.2.7.5 Obesidad**

El exceso de peso y la obesidad en la infancia se asocian con mayor probabilidad de ser adultos obesos (Geserick *et al.*, 2018) y mayor riesgo de sufrir ENT y cáncer en etapas posteriores de la vida (Reilly y Kelly, 2011; Llewellyn *et al.*, 2016; Céline *et al.*, 2019; Bjerregaard *et al.*, 2020). También se ha estudiado la relación entre la obesidad infantil y los trastornos mentales en edad adulta con resultados inconsistentes. Mientras que hay estudios que han observado una asociación entre la obesidad infantil y el riesgo de depresión en edad adulta (Sánchez-Villegas *et al.*, 2010; Sanderson *et al.*, 2011), otros resultados no han encontrado esta asociación (Geoffroy y Power, 2014; Gibson-Smith *et al.*, 2020).

También hay datos científicos sobre el gasto económico sanitario, sin valorar otro tipo de costos, de la obesidad infantil a lo largo de la vida (Finkelstein *et al.*, 2014).

Los datos de prevalencia en Europa rondan el 25% de sobrepeso en los escolares (NCD-RisC, 2017). Se dispone de pocos estudios de prevalencia de obe-

sidad referida a preescolares en Europa, pero apunta a una distribución similar a la de la edad escolar (Ahrens *et al.*, 2014). Según la última Encuesta Nacional de Salud de la población española (2017), continúa el aumento paulatino de la prevalencia de la obesidad infantil con una sobrecarga ponderal (obesidad + sobrepeso) del 28,56% en niños y 28,4% en niñas en el grupo de edad entre 2 y 17 años. Los porcentajes de obesidad y sobrepeso en el grupo de edad de 2 y 4 años son del 19,94% y del 11,97%, respectivamente (MSCBS, 2018).

Previamente, ya se habían realizado estudios en nuestro país basados en mediciones antropométricas individuales. El estudio enKid (1998-2000) estimó una prevalencia de sobrecarga ponderal del 24,5% y de obesidad del 6,2% (Serra-Majem *et al.*, 2006). Si comparamos esos valores en la misma franja de edad (2-24 años) con los del estudio ENPE, observamos que 15 años después el IMC aumenta progresivamente en las últimas décadas (sobrepeso 30,1% y obesidad 10,3%). En este reciente estudio, la población de entre 3 y 8 años alcanzó una prevalencia de sobrepeso en torno al 40% y de obesidad del 16,3% (Aranceta-Bartrina *et al.*, 2020).

En edad escolar (6-9 años) la AESAN realizó el estudio ALADINO (2011-2019), con una prevalencia estimada en 2011 del 26,2% de sobrepeso y del 18,3% de obesidad, y en 2019 del 23,3% y 17,3%, respectivamente (AESAN, 2013, 2020b). Las cifras son similares a las estimadas por el Proyecto PERSEO 2007-2008 en escolares de 6-10 años, con un 24,6% de sobrepeso y un 12,8% de obesidad (Aranceta-Bartrina *et al.*, 2013b).

Respecto a la edad preescolar, a parte de los resultados del estudio ENPE, destacan los del estudio ELOIN realizado en la Comunidad de Madrid en el que se determinó la persistencia y variación del sobrepeso y la obesidad en una cohorte de niños durante 2 años. A los 4 años presentaban sobrepeso el 8,6% y obesidad el 3,0%, y a los 6 años el 13,8% y el 6,1%, respectivamente. Es decir la obesidad se duplicó, ya que 3 de cada 4 niños permanecieron obesos y uno de cada 4 niños con sobrepeso desarrolló obesidad (Ortiz-Marrón *et al.*, 2018).

Esta enfermedad, que suele iniciarse en la infancia y adolescencia, se debe a una interacción genética y ambiental. Aunque los factores hereditarios son importantes, el rápido aumento de prevalencia de sobrepeso y obesidad experimentado en las últimas décadas pone de manifiesto que el ambiente o el entorno juegan un papel primordial en su desarrollo. El llamado ambiente obesogénico, caracterizado por abundancia de alimentos y sedentarismo, origina un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético que es la causa de esta epidemia (Lucas y Feucht, 2009; Muñoz y Martí, 2008).

En este sentido, Moreiras *et al.* (2013) relacionaron las elevadas prevalencias de obesidad en la infancia con un elevado consumo de alimentos procesados energéticos, ricos en grasas, azúcares y proteínas, un bajo consumo de frutas y verduras, un nivel educativo y socioeconómico familiar bajo, sedentarismo y pocas horas de sueño. A esos factores predisponentes, habría que añadir la omisión del desayuno y otros factores relacionados con la actividad física y estilos de vida de

los escolares (p. ej. dedicar más de 2 horas al día a ver la televisión, jugar con el ordenador o videoconsola, etc.) (AESAN, 2020b).

En España, el 44,4% de la población de 1-14 años consume dulces a diario, y el 5,6% toma refrescos con azúcar con esa frecuencia (MSCBS, 2018). El Proyecto PERSEO puso de manifiesto que, al inicio del mismo, solo el 6,5% de los niños cumplía las recomendaciones de consumo de frutas y verduras (al menos 5) y, tras la intervención, más del 50% refirió un aumento en el consumo de este grupo de alimentos y también un menor consumo de aperitivos salados (53%), dulces (58%) y bebidas azucaradas (28%) (Aranceta-Bartrina *et al.*, 2013a).

#### **2.2.7.6 Alergias e intolerancias alimentarias**

No hay evidencias suficientes para retrasar la introducción de ciertos alimentos como medida de prevención de alergias o intolerancias alimentarias, incluso esta demora en ciertos alimentos puede elevar el riesgo de reacción adversa a los alimentos. Sí parece haber, no obstante, un mayor riesgo de reacción adversa si se introducen alimentos sólidos muy precozmente (antes de los 4 meses) (Nwaru *et al.*, 2010; Muraro *et al.*, 2014). Otro punto de debate relacionado con las alergias alimentarias es si la lactancia materna exclusiva previene las alergias alimentarias, pero no existen conclusiones claras. Únicamente se podría relacionar la lactancia materna exclusiva en los primeros cuatro meses con una posible disminución en el riesgo de alergia a la proteína de leche de vaca (Perkin *et al.*, 2016).

Respecto a la celiaquía, la ESPGHAN indica que no hay influencia en el riesgo de desarrollar la enfermedad celíaca si se introduce el gluten entre los 4 y los 12 meses de edad (Szajewska *et al.*, 2016).

La intolerancia a la lactosa es bastante frecuente en niños, en los que origina una sintomatología con diarreas, dolor abdominal y retraso de crecimiento, por lo que hay que evitar su ingesta. Esta intolerancia puede predisponer a una ingesta baja de leche y, por ende, de calcio, lo que podría conllevar problemas óseos. Un reciente estudio ha demostrado que la deficiencia de lactosa no tiene impacto en la absorción de calcio y la salud ósea. Sin embargo, la intolerancia a la lactosa puede provocar fragilidad ósea debido al no consumo de productos lácteos, principalmente en niños (Hodges *et al.*, 2019).

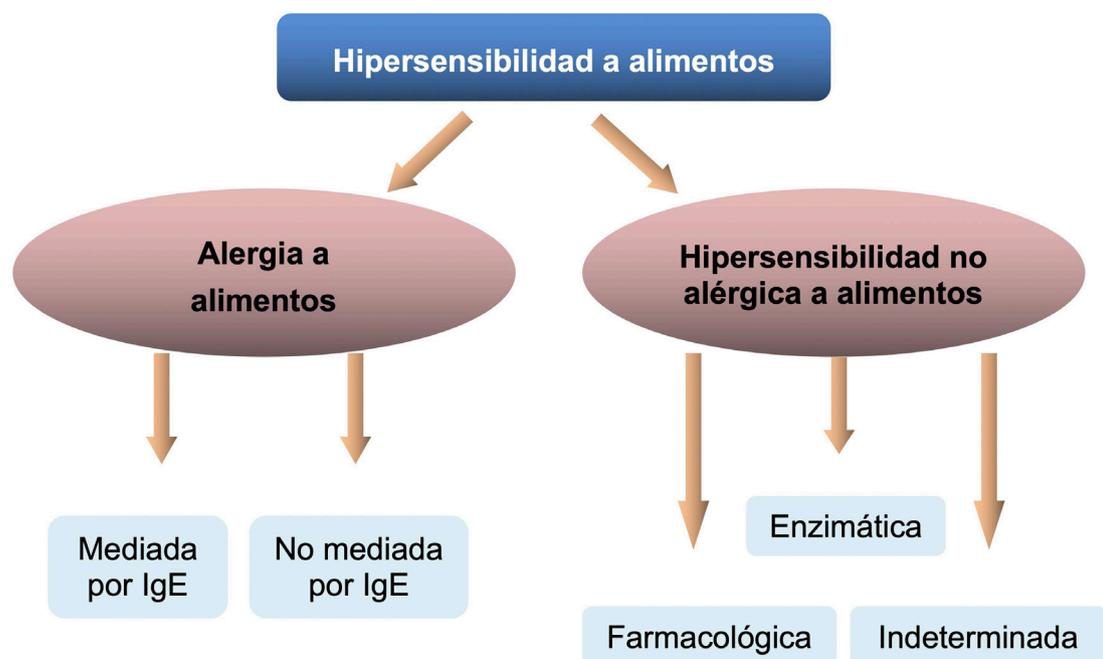
### **2.3 SUSTANCIAS CAUSANTES DE REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD ALIMENTARIA**

#### **2.3.1 Reacciones adversas a los alimentos**

Una reacción adversa a los alimentos (RAA) es cualquier respuesta clínicamente anormal que puede atribuirse a la ingestión, contacto o inhalación de un alimento, de sus derivados o de uno de sus aditivos. Esta terminología engloba tanto a las alergias alimentarias como a las intolerancias alimentarias y afecta tanto a población adulta como a infantil (Ruiz *et al.*, 2018). Últimamen-

te, se ha evidenciado un aumento de las RAA, probablemente debido a los cambios de estilo de vida producidos en las últimas décadas.

El término “alergia alimentaria” se ha utilizado en ocasiones de manera imprecisa para definir cualquier RAA. La Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI, *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) publicó una nueva nomenclatura en 2001, revisada por la Organización Mundial de Alergia (WAO, *World Allergy Organization*) en 2003 (Figura 9), en la que se define la hipersensibilidad a alimentos como cualquier reacción adversa a los mismos (Macías, 2018), y la alergia a los alimentos como las reacciones de hipersensibilidad mediadas por mecanismos inmunológicos. A su vez, se distingue entre alergia mediada por IgE y alergia no mediada por IgE, en base a si la reacción de hipersensibilidad está provocada por anticuerpos IgE específicos frente a un determinado alimento, o si es consecuencia de otros mecanismos inmunológicos (Johansson *et al.*, 2004). En el caso de que no intervengan mecanismos inmunológicos se trata de una hipersensibilidad no alérgica a alimentos, anteriormente denominada intolerancia.



**Figura 9.** Clasificación de las hipersensibilidades a alimentos de la EAACI, refrendada por la WAO (Johansson *et al.*, 2004)

### 2.3.2 Alergias alimentarias

Los alérgenos alimentarios son proteínas o glicoproteínas hidrosolubles con un tamaño comprendido entre 10 y 70 kDa. La mayoría son estables al calor, a los ácidos y a las proteasas. Un alimento puede contener varias proteínas alergénicas. A su vez, un alérgeno puede ser característico de un determinado alimento, mientras que otros pueden ser compartidos con especies de la misma familia o una próxima, incluso por una familia alejada filogénicamente. Los panalérgenos son aquellos alérgenos que se encuentran ampliamente

difundidos y pueden estar implicados en las polisensibilizaciones que se detectan en muchos pacientes, tanto a alimentos solamente como a alimentos y neuroalérgenos conjuntamente. Por último, también se pueden producir fenómenos de reactividad cruzada entre alérgenos con una relación taxonómica alejada, que son reconocidos por un mismo tipo de IgE, como ocurre en los síndromes polen-frutas, látex-frutas o ácaros-marisco (AESAN, 2007).

En la Tabla 22 se muestran los alérgenos alimentarios más frecuentes implicados en reacciones de hipersensibilidad a alimentos en la población española (AESAN, 2007).

**Tabla 22.** Principales alérgenos alimentarios.

Origen	Alérgeno	Alimentos relacionados
<b>Animal</b>	Leche de vaca	Lácteos y derivados
	Huevo	Gallina, pata, pava, gansa, codorniz, avestruz y derivados
	Pescado	Gadiformes (bacalao, merluza, faneca), pleuronectiformes (lenguado, gallo), salmoniformes (salmón), clupeiformes (sardina, boquerón), escómbridos (atún)
	Crustáceos y moluscos	Gasterópodos (caracoles), lamelibranquios (almejas, mejillones, ostras), cefalópodos (pulpo, calamar), decápodos (gamba, cigala)
<b>Vegetal</b>	Legumbres	Papilionaceae (lenteja, garbanzo, judía, guisante, cacahuete, soja, altramuza)
	Cereales	Trigo, cebada, centeno, avena, arroz, maíz
	Frutas y hortalizas	Rosaceae (melocotón, albaricoque, manzana, pera, ciruela, cereza), Cucurbitaceae (melón, sandía, pepino, calabaza, calabacín), Musaceae (plátano), Actinidiaceae (kiwi), apio, tomate
	Frutos secos	Almendra, avellana, anacardo, nuez de nogal, nuez de Brasil, nuez de Pecan, pistacho, piñón, semilla de sésamo, de girasol
<b>Aditivos alimentarios</b>	Especias	Mostaza
	Colorantes	Tartracina (E-102), carmín de cochinilla (E-120), eritrosina (E-120), annato (E-160B)
	Potenciadores de sabor	Glutamato monosódico (E-621)
	Conservantes	Sulfitos (E-220 a E-228), hidroxibenzoato (E-214)
<b>Vehiculados por alimentos</b>	Anitoxidantes	Tocoferol (E-306)
	Residuos de antibióticos	
	Anisakis	
	Látex	
Ácaros (Dermatophagoides)		

Fuente: Elaboración propia con datos de AESAN (2007).

Respecto a la epidemiología de las alergias alimentarias, la revisión de Sicherer y Sampson (2018) confirma que han aumentado en los países industrializados en las últimas décadas, con una prevalencia de hasta el 10%, siendo más común en niños que en adultos. En la población europea, la alergia alimentaria presenta una prevalencia del 6% según una revisión sistemática y meta-análisis sobre estudios científicos publicados entre 2000 y 2012 (Nwaru *et al.*, 2014). Estos autores también identificaron los alimentos que con mayor frecuencia causan alergias alimentarias en diferentes grupos de edad y regiones de Europa, concluyendo que la alergia a la leche de vaca y al huevo son las más frecuentes, especialmente en niños.

En cuanto a la población infantil, el estudio de cohortes multicéntrico *EuroPrevall* en los 2 primeros años de vida llevado a cabo en 9 países europeos, reportó una incidencia media ajustada de alergia a leche de vaca de 0,74%, oscilando entre un 0 y un 1,29% entre los países participantes (Schoemaker *et al.*, 2016). Los datos de *EuroPrevall* para la alergia al huevo de gallina revelaron una incidencia media ajustada de 1,23% (Xepapadaki *et al.*, 2015).

En España, la situación es similar a la europea. Sánchez-López *et al.* (2017) llevaron a cabo, entre marzo de 2008 y marzo de 2010, una investigación sobre 618 pacientes que se clasificaron en dos grupos de edad: mayores y menores de 14 años. Los resultados obtenidos en el grupo infantil determinaron que la leche y el huevo fueron los principales alimentos causantes de alergias. El estudio *Alergológica 2015*, dirigido a pacientes pediátricos entre 4 meses y 14 años, identificó como principales alimentos causantes de alergias alimentarias a la leche, huevo, fruta y nueces (Ojeda *et al.*, 2018). Por último, el estudio realizado por el Hospital Universitario Severo Ochoa de Madrid sobre una cohorte de 1198 recién nacidos, estableció una incidencia global de alergia alimentaria a los 12 meses de vida del 3,92%, siendo el alimento implicado con mayor frecuencia la leche de vaca (2,42%), seguido del huevo (1,50%), pescado (0,16%) y fruta (0,08%) (Bellón *et al.*, 2018). Esta disparidad entre los resultados de prevalencia reportados en la literatura se debe a los distintos factores de riesgo, como son el sexo, la edad, la raza y etnia, las variaciones geográficas, la población de estudio, el tipo de dieta, la metodología empleada o las diferentes definiciones de alergia alimentaria (Sicherer y Sampson, 2018).

Dependiendo del alérgeno, la alergia alimentaria de un individuo puede evolucionar hasta la pérdida de la sensibilización al mismo (tolerancia oral). Así, se ha demostrado que, en el caso de la alergia a la leche, el 50% de los individuos alcanzan una tolerancia oral a los 5-10 años de edad y, en el caso de la alergia al huevo, a los 2-9 años. Sin embargo, otras alergias alimentarias tienen una baja tasa de resolución en la infancia: cacahuete (aproximadamente el 20% a los 4 años), frutos secos (alrededor del 10%), considerándose persistentes las alergias al pescado y marisco (Savage *et al.*, 2016).

Las Academias Nacionales de Ciencias, Ingeniería y Medicina de EE. UU. (NAS, *National Academies of Sciences, Engineering and Medicine*) plantean diferentes hipótesis para explicar el riesgo de desarrollar alergia alimentaria:

hipótesis de la exposición alérgica dual (sensibilización temprana a dosis bajas de alérgenos alimentarios presentes en el ambiente a través de la piel dañada), hipótesis de la higiene (la exposición temprana a microorganismos desarrolla respuestas inmunorreguladoras tempranas, así como el desarrollo de tolerancia oral), hipótesis de la vitamina D (relación entre el aumento de alergia alimentaria y el incremento de la prevalencia de la insuficiencia de vitamina D), e hipótesis de la evitación alérgica (consumo temprano de la proteína alimentaria induce la alergia alimentaria) (NAS, 2016).

El mecanismo fisiopatológico común que ocurre en las alergias alimentarias es el fallo inmunológico y de la tolerancia oral a un alimento ingerido, provocando reacciones mediadas por IgE o trastornos no mediados por IgE. A pesar de las investigaciones en curso sobre las reacciones no mediadas por IgE, continúa habiendo poco conocimiento sobre los mecanismos inmunopatogénicos implicados en este tipo de alergias alimentarias (Sicherer y Sampson, 2018). Respecto a las alergias alimentarias mediadas por IgE, la sensibilización a los alérgenos alimentarios (proteínas y péptidos) puede ocurrir en el tracto gastrointestinal, en la cavidad oral, en la piel y, con menos frecuencia, en el tracto respiratorio.

El alérgeno alimentario capturado por las células dendríticas proinflamatorias es presentado a linfocitos Th0 en presencia de mediadores de respuesta inmune tipo 2 (IL-4), promoviendo el desarrollo de Th2. Estos, segregan citoquinas adicionales de tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-13) que promueven el cambio de células B hacia el isotipo productor de IgE específica frente al antígeno. Las exposiciones futuras al antígeno del alimento al que se ha sensibilizado, pueden activar a las IgE y desencadenar una cascada de interleucinas tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-13), que liberarán a los mediadores inflamatorios (histamina, prostaglandinas, leucotrienos y triptasa). De esta manera, se producirá la respuesta tisular responsable de los síntomas clínicos en piel, mucosas y otros tejidos (Sampson *et al.*, 2018).

Las manifestaciones clínicas de las alergias alimentarias son muy heterogéneas, desde la presentación de unos síntomas leves hasta una grave anafilaxia, apareciendo normalmente en un tiempo inferior a una hora tras la ingestión del alimento. En el estudio de Sánchez-López *et al.* (2017), las manifestaciones clínicas más comunes, en toda la población de estudio, fueron urticaria (48,2%), síndrome de alergia oral (25,6%) y anafilaxia (24,8%). Otros síntomas, como los gastrointestinales, respiratorios y eccema, se presentaron con una baja frecuencia (6,6%, 2,4% y 2,2%, respectivamente). En el estudio *Alergológica 2015*, las presentaciones clínicas más frecuentes fueron la cutánea (69,2%), con urticaria, angioedema y dermatitis atópica, seguida por la digestiva (37,2%) y el síndrome de alergia oral (18,1%). En el 7,5% de los casos apareció anafilaxia, rinitis en el 6,4%, asma en el 4,3% y, por último, solo un 1,1% presentaron anafilaxia inducida por el ejercicio (Ojeda *et al.*, 2018).

Puede ocurrir que la sintomatología no esté mediada por IgE, como ocurre en el síndrome de enterocolitis inducida por proteínas alimentarias o proctocolitis

inducida por proteínas alimentarias, o bien, que sea mixta, como ocurre en la gastroenteropatía eosinofílica (Sicherer y Sampson, 2018).

La base del diagnóstico de las alergias alimentarias es la historia clínica, que permite establecer una asociación causal entre el alimento sospechoso y el cuadro clínico y orienta sobre el mecanismo inmunológico implicado. Una buena anamnesis deberá recoger datos sobre la edad del paciente, los síntomas presentados, el tiempo de latencia entre la ingesta del alimento sospechoso y la aparición de síntomas, la tolerancia previa a dicho alimento, la cantidad ingerida, el modo de preparación, la posible reactividad cruzada y una exploración física del estado de la piel, aparato digestivo y respiratorio (Muraro *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2017; Gupta *et al.*, 2018; Sicherer y Sampson, 2018). Esta historia se debe poner en contexto con las manifestaciones clínicas y realizar el diagnóstico diferencial con otras posibles patologías. La información adicional para el diagnóstico se obtiene de las pruebas cutáneas intraepidérmicas, la determinación de IgE sérica específica y la provocación oral alimentaria.

Las pruebas cutáneas intraepidérmicas permiten estudiar la sensibilización mediada por anticuerpos IgE en los pacientes sospechosos de sufrir una alergia alimentaria. La técnica consiste en depositar una gota de extracto alérgico, un control positivo (histamina) y un control negativo (suero salino) en la cara interna del antebrazo y hacer una punción en la piel con una lanceta a través de la gota depositada. La lectura de los resultados se efectúa a los 15 minutos, considerándose positivo si se origina un habón con un diámetro, al menos, 3 mm mayor que el originado tras la inoculación del control negativo (Muraro *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2017; Gupta *et al.*, 2018; Sicherer y Sampson, 2018).

La determinación de la IgE sérica específica es otra herramienta diagnóstica, útil especialmente en aquellos pacientes que se oponen a las pruebas cutáneas intraepidérmicas, que presentan dermatitis atópica severa o que no pueden suspender su tratamiento con antihistamínicos. Además, el seguimiento de los niveles de IgE específica puede predecir la resolución de la alergia o tomar la decisión de realizar una prueba de exposición oral alimentaria (Gupta *et al.*, 2018).

Tanto las pruebas cutáneas intraepidérmicas como la determinación de IgE específica tienen una alta sensibilidad, pero una especificidad y valor predictivo positivo bajos. Por sí solas no sirven de diagnóstico y un resultado positivo solo indica sensibilización mediada por IgE al alimento estudiado, por lo que la interpretación debe ir acompañada de la historia clínica. En algunas alergias alimentarias, como a la leche y al huevo, con un valor predictivo positivo superior al 95%, sí se ha encontrado correlación entre el tamaño del habón y los niveles de IgE sérica específica con la relevancia clínica, aunque no es indicador de la gravedad de la reacción. Ambas técnicas son incapaces de diferenciar entre una alergia clínicamente relevante y tolerancia oral, por lo que es necesario realizar una prueba de exposición o provocación oral alimentaria

controlada. No obstante, antes de llegar a este punto, se puede implantar una dieta de eliminación del alimento sospechoso con una duración de 2 a 4 semanas, como complemento a estas pruebas diagnósticas (Gupta *et al.*, 2018).

La prueba de exposición oral doble ciego controlada con placebo (DBPCFC, *Double-Blind, Placebo-Controlled Food Challenge*) se considera el estándar de referencia para el diagnóstico de una alergia alimentaria mediada por IgE. El test consiste en administrar pequeñas cantidades de alimento que se van aumentando de forma semilogarítmica cada 15-30 minutos hasta llegar a la dosis máxima requerida. A continuación, se mantiene al paciente dos horas en observación para detectar una posible reacción inmediata o tardía (Muraro *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2017; Gupta *et al.*, 2018; Sicherer y Sampson, 2018). Sin embargo, es una prueba no exenta de riesgos, que precisa de infraestructura adecuada y personal cualificado, por lo que su práctica no es habitual. Según el estudio de *Alergológica 2015*, solo se realizaron pruebas de exposición oral alimentaria en el 15,6% de los pacientes diagnosticados de alergia a alimentos (Ojeda *et al.*, 2018).

Finalmente, otras posibles herramientas diagnósticas son la activación de basófilos y el diagnóstico molecular o resolución diagnóstica por componentes (Muraro *et al.*, 2014).

El tratamiento de las alergias alimentarias incluye intervenciones a corto plazo para las reacciones agudas y estrategias a largo plazo para minimizar el riesgo de reacciones futuras.

La evaluación del riesgo de reacciones agudas es crucial para el manejo clínico de las alergias alimentarias. En el caso de pacientes con historial de anafilaxia inducida por alimentos, se les tiene que prescribir epinefrina autoinyectable. Otros tratamientos como los antihistamínicos son apropiados en casos donde hay ausencia de síntomas sistémicos o con ligeros síntomas cutáneos (Moore *et al.*, 2017).

La dieta de eliminación del alimento implicado y sus derivados es el tratamiento de elección de la alergia alimentaria a largo plazo, incluso evitar el contacto cutáneo o la inhalación de partículas alergénicas del alimento en los casos más extremos. Para el correcto cumplimiento de la dieta de exclusión es esencial educar al paciente en aspectos como el etiquetado de alimentos, las posibles ingestas inadvertidas de alérgenos ocultos, el consumo de comidas dentro y fuera de casa (restaurantes, colegios, campamentos, etc.), y el conocimiento de cofactores (ejercicio físico, AINES, alcohol, etc.) (Muraro *et al.*, 2014).

Dietas de eliminación inadecuadas pueden provocar a largo plazo déficits nutricionales, especialmente en niños alérgicos a la leche y huevo. En el caso de la alergia a proteína de leche de vaca la solución ideal sería la continuación con leche materna. Cuando no sea posible esta opción existen fórmulas alternativas (hidrolizadas, de aminoácidos y de soja) a las que se les podría añadir probióticos (Muraro *et al.*, 2014).

La inmunoterapia está indicada para el tratamiento de alergias alimentarias graves o múltiples y consiste en la desensibilización progresiva administrando dosis controladas y repetidas del alérgeno hasta conseguir la tolerancia oral. Las vías de administración son diversas: oral, para las alergias a la leche y huevo; sublingual, para las alergias a melocotón y cacahuete; y epicutánea, en investigación actualmente (Muraro *et al.*, 2014). No obstante, la inmunoterapia oral puede dar lugar a reacciones adversas, especialmente durante la fase de iniciación. Para reducir estos eventos indeseables se ha utilizado la administración de anticuerpos monoclonales humanizados anti-IgE, como el Omalizumab, previa y simultáneamente a la inmunoterapia oral, mejorando la seguridad del protocolo y aumentando el umbral de tolerancia a los alérgenos alimentarios (Moore *et al.*, 2017).

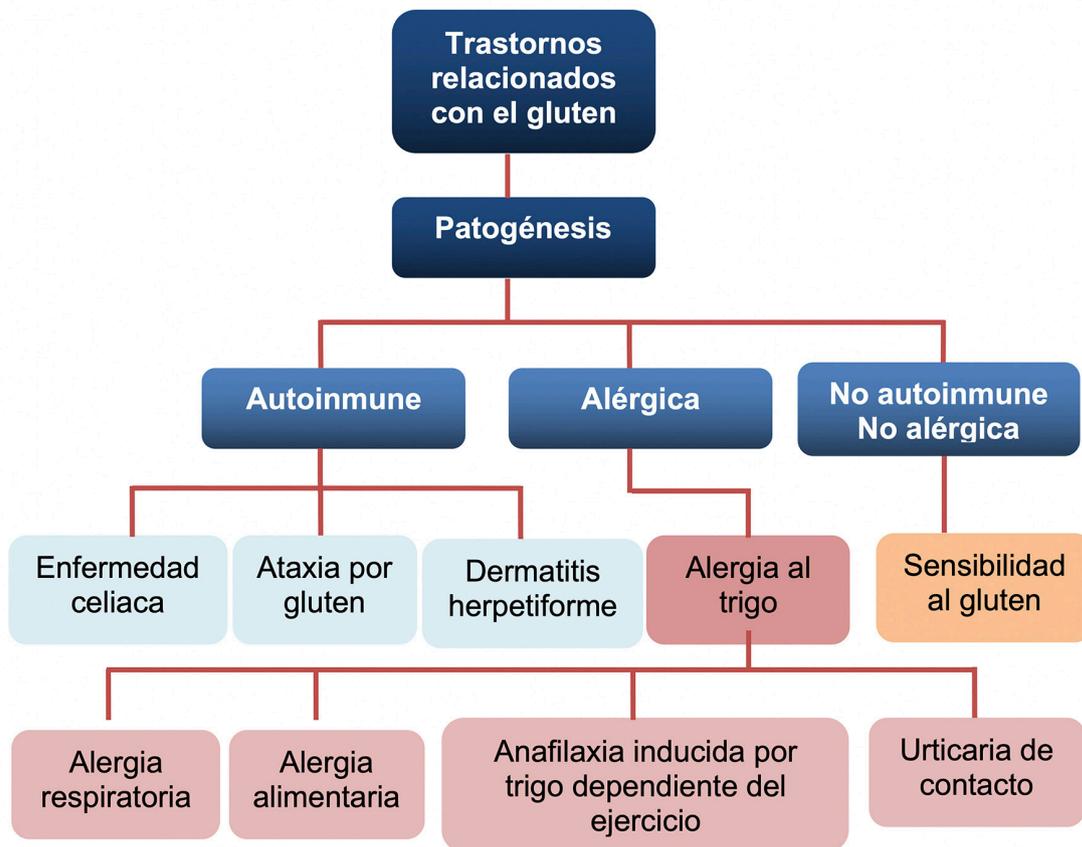
Las hipótesis mencionadas anteriormente para explicar el riesgo de desarrollar alergia alimentaria (NAS, 2016), además de explicar el aumento de la prevalencia de las alergias alimentarias, también han impulsado nuevas investigaciones con el objetivo de prevenir las alergias alimentarias. La introducción temprana de los alimentos alergénicos en la dieta es una forma de prevención primaria. Los resultados más esperanzadores se han obtenido con el cacahuete en niños de alto riesgo. Respecto al huevo, se ha encontrado una protección moderada si se introduce entre los 4 y 6 meses de edad. En el caso de la leche de vaca, se ha asociado el desarrollo de eccema a los 2 años con un retardo en la introducción de leche. Asimismo, hay pocos datos que apoyen la dieta de eliminación materna durante el embarazo y lactancia para prevenir las alergias alimentarias o el retraso de la lactancia materna (Du Toit *et al.*, 2016; Sicherer y Sampson, 2018).

Otras estrategias preventivas, que requieren más investigación científica, son la suplementación con vitamina D (la hidratación de la piel para mejorar su función de barrera podría reducir el riesgo de eccema y, teóricamente, el de alergia alimentaria) o la utilización de probióticos y fórmulas infantiles hipoalérgicas (Du Toit *et al.*, 2016; Sicherer y Sampson, 2018).

### **2.3.3 Hipersensibilidad no alérgica al gluten**

El gluten es el principal complejo proteico presente en cereales como el trigo, centeno, cebada y, en menor proporción, avena. Las prolaminas (prolina y glutamina) constituyen la fracción del gluten que provoca la reacción de hipersensibilidad no alérgica; dicha fracción se denomina gliadina en el trigo, secalina en el centeno, hordeína en la cebada y avenina en la avena (García-Molina *et al.*, 2019).

Los avances sobre la fisiopatología de los diferentes trastornos inducidos por el gluten también han llevado a una actualización de su nomenclatura. Así, Sapone *et al.* (2012) publicaron una clasificación de estos trastornos en función del tipo de inmunidad que media. Paralelamente, Ludvigsson *et al.* (2013) establecieron una terminología uniforme para denominar la enfermedad celíaca o celiacía y otros trastornos asociados al gluten (Figura 10).



**Figura 10.** Nomenclatura y clasificación de los trastornos provocados por el gluten (Sapone *et al.*, 2012)

A continuación, nos centraremos exclusivamente en la descripción de la enfermedad celíaca por ser el único trastorno relacionado con el gluten presente en los niños de los CEI del Ministerio de Defensa.

La celiaquía afecta aproximadamente al 1% de la población europea (Mustalahti *et al.*, 2010; Altobelli *et al.*, 2014), oscilando los valores de prevalencia en la población infantil entre el 1 y el 3% en los países de Occidente (Vriezinga *et al.*, 2015).

En cuanto a los factores de riesgo, además de la predisposición genética, contribuyen otros factores como el tipo de parto (vaginal o por cesárea), estación del año del nacimiento, método de alimentación del recién nacido, momento de la introducción del gluten en la dieta, entre otros (Pietzak, 2012). Al contrario de lo indicado para algunas alergias alimentarias, la celiaquía no se resuelve con la edad y persiste durante toda la vida. La celiaquía conlleva complicaciones nutricionales, reproductivas y un aumento en el riesgo de mortalidad por todas las causas y en el riesgo de sufrir neoplasias. No obstante, el riesgo de complicaciones y mortalidad disminuye con la adherencia a una dieta libre de gluten (Degeorge *et al.*, 2017).

El mecanismo fisiopatológico de la celiaquía lo explican dos condiciones imprescindibles para su desarrollo: la intolerancia inmunológica y permanente a

las fracciones proteicas del gluten (gliadina y glutenina) presentes en el trigo, cebada, centeno y avena, y la predisposición genética a la enfermedad celíaca. Si los pacientes no tienen antígenos leucocitarios humanos (HLA) DQ2 o DQ8, tienen un riesgo muy bajo de desarrollar celiacía (Pietzak, 2012).

Cuando una persona celíaca ingiere gluten, la gliadina penetra en la lámina propia del intestino delgado e induce una respuesta inmune adaptativa dependiente de la desamidación de la molécula de gliadina por la enzima transglutaminasa tisular-2 (tTG), el autoantígeno predominante en la celiacía. Los péptidos de la gliadina interactúan con los antígenos HLA DQ2 o HLA DQ8 de la superficie de las células presentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos y células B), lo que conduce a la activación de los linfocitos T CD4+ expresando citoquinas pro-inflamatorias, principalmente interferón- $\gamma$ . A la respuesta adaptativa le acompaña una respuesta inmune innata en el compartimento epitelial. Los péptidos originados causan daños en el epitelio que provocan una respuesta inmune innata caracterizada por la sobreexpresión de IL-15 que, a su vez, activa a los linfocitos intraepiteliales que ejercen acción citotóxica en los enterocitos. Todo ello, causa la atrofia de las vellosidades intestinales, la hiperplasia de criptas y la generación de linfocitos B con la consecuente producción de anticuerpos (Schuppan *et al.*, 2009; Lebowohl *et al.*, 2018).

La manifestación clínica de la celiacía ha cambiado de los clásicos síntomas de malabsorción en la infancia (diarrea crónica, distensión abdominal, pérdida de peso y retraso en el crecimiento) a síntomas no clásicos, tanto en niños como en adultos, como el déficit de hierro, estreñimiento, fatiga crónica, dolor de cabeza, dolor abdominal y osteoporosis (Lebowohl *et al.*, 2018). También se ha descrito una malnutrición proteico-calórica y déficits de minerales (zinc, selenio) y vitaminas (ácido fólico, vitamina B6, B12, D, E y K), así como otros síntomas no intestinales entre los que destacan los que afectan al sistema músculo-esquelético (artritis, dolor muscular y defectos en el esmalte dental), los síntomas neuro-psiquiátricos (convulsiones, ansiedad, depresión, esquizofrenia y neuropatía periférica) y los problemas de fertilidad o abortos espontáneos en mujeres (Pietzak, 2012; Vriezinga *et al.*, 2015; Degoerge *et al.*, 2017).

Por otro lado, en el 25% de los pacientes, la celiacía se presenta asociada a otros trastornos autoinmunes, como la tiroiditis autoinmune (en el 10%), la hepatitis autoinmune (en <1%), la enfermedad intestinal inflamatoria y la enfermedad de Addison, a la diabetes tipo I (un 3%), a la deficiencia de IgA y a alguna cromosomopatía como los síndromes de Down, de Turner y de Williams (Elli *et al.*, 2015; Vriezinga *et al.*, 2015; Ortiz *et al.*, 2017).

El diagnóstico de la celiacía está basado en la combinación de los hallazgos de la historia clínica del paciente, las pruebas serológicas y la biopsia duodenal para la confirmación de los daños histológicos de enteropatía. La endoscopia intestinal para la toma de biopsia duodenal debe realizarse antes del inicio de la dieta libre de gluten, con el fin de poder confirmar la enteropatía (Elli *et al.*, 2015).

En adultos, la prueba de referencia (*gold standard*) es la biopsia intestinal, recomendándose, al menos, cuatro biopsias de duodeno, puesto que el daño en la mucosa duodenal se distribuye uniformemente y así se reduce la probabilidad de falsos negativos. Los signos de la enteropatía relacionada con la celiaquía son un aumento de los linfocitos intraepiteliales, hiperplasia de criptas y la atrofia vellositaria y se evalúan de acuerdo a los grados de lesión establecidos por Marsh y Oberhuber (Elli *et al.*, 2015).

En los pacientes con deficiencia de IgA, que es más común en los individuos celíacos que en la población general, la determinación de anticuerpos IgA tTG puede llevar a falsos negativos, por lo que se recomienda medir IgA totales. También se deberían determinar los anticuerpos IgG tTG o IgG anti péptidos deaminados de gliadina (DGPA) (Vriezinga *et al.*, 2015; Ortiz *et al.*, 2017; De-george *et al.*, 2017).

En determinadas situaciones clínicas, como en el caso de personas de riesgo que ya han instaurado una dieta libre de gluten o en pacientes seronegativos con hallazgos histológicos dudosos, se recomienda realizar un genotipado de HLA (DQ2/DQ8), que permite excluir la celiaquía debido a su alto valor predictivo negativo, puesto que el 95% de los pacientes celíacos son portadores del heterodímero HLA-DQ2 y el otro 5% del HLA-DQ8 (Elli *et al.*, 2015).

En niños mayores de 2 años, se ha propuesto la medición de la concentración de anticuerpos IgA contra tTG como primera opción de cribado para el diagnóstico, debido a su alta sensibilidad y valor predictivo negativo y a su menor coste en comparación con los anticuerpos antiendomiso (EMA). Estos últimos, tienen una mayor especificidad (99%) y son usados como prueba de confirmación en los casos de diagnóstico dudoso en poblaciones de alto riesgo (parientes de primer grado de pacientes celíacos, pacientes con diabetes mellitus tipo I y pacientes con síndrome de Down) (Elli *et al.*, 2015; Lebwhol *et al.*, 2018).

Para el diagnóstico en niños menores de 2 años se utilizan, en combinación con anticuerpos IgA tTG, los anticuerpos IgA e IgG DGPA que sustituyen a los anticuerpos antigliadina (presentan menor sensibilidad). En 2012, La ESPGHAN acordó que, en presencia de síntomas clínicos, de niveles de anticuerpos tTG 10 veces mayores al valor de corte y de positivo a EMA y HLA, un niño puede ser diagnosticado de celiaquía, apoyado por la remisión de los síntomas clínicos tras 6 meses de dieta libre de gluten. Si no concurren estos criterios, se debe seguir el protocolo de los pacientes adultos, consistente en una endoscopia con toma de biopsias duodenales (Elli *et al.*, 2015; Vriezinga *et al.*, 2015).

La base del tratamiento de la celiaquía es la eliminación del gluten en la dieta. A diferencia de lo que se ha descrito para el manejo de las alergias alimentarias, las reacciones inmunológicas en la celiaquía no comprometen la vida con un cuadro de anafilaxia, por lo que no es necesario un tratamiento para reacciones agudas (Pietzak, 2012). El cumplimiento de la dieta libre de

gluten mejora la sintomatología en semanas y en unos meses se normalizan los niveles serológicos de anticuerpos y la atrofia de las vellosidades intestinales. Es conveniente hacer un seguimiento de esta mejoría y, además, incluir pruebas para el control de posibles deficiencias nutricionales (hierro, ácido fólico, vitamina B12, vitamina D) (Vriezinga *et al.*, 2015; Lebwhol *et al.*, 2018).

No obstante, actualmente se están investigando tratamientos alternativos a la dieta sin gluten, basados en la inactivación de la gliadina intraluminal (polímeros secuestra-gluten, como el BL-7010), el uso de anticuerpos neutralizantes de gluten (como el AGY procedente de la yema de huevo de gallina), la modulación de la permeabilidad de la mucosa intestinal al paso de la gliadina (antagonistas del zonulin, como el acetato de larazotide), la inducción de la tolerancia en la mucosa e inactivación del proceso inmune en la lámina propia (vacunas, como la Nexvax2® de ImmusanT) o la regulación de la respuesta inmune adaptativa (inhibidores tTG e inhibidores de HLA-DQ2) (Lebwhol *et al.*, 2018; Vaquero *et al.*, 2018; Yoosuf y Makharia, 2019).

Otro avance tecnológico innovador sería la introducción de técnicas que permitan la obtención de variedades de trigo exentas de los péptidos inmunogénicos de gluten, manteniendo las propiedades nutricionales, organolépticas y tecnológicas (aptitud para el horneado). Entre las estrategias utilizadas por la ingeniería genética, se encuentra la selección de variantes de trigo con un contenido reducido de epítomos inmunogénicos, como cepas de trigo hexaploide generado a partir de especies de trigo diploide y tetraploide ancestrales o salvajes (*tritordeum* o el *triticum*). También, técnicas para la modificación genética del trigo, como la interferencia de ARN y CRISPR/Cas9, que silencian genes de gluten que contienen epítomos para la celiaquía (las fracciones  $\alpha$ -gliadina, principalmente) (Vaquero *et al.*, 2018; García-Molina *et al.*, 2019).

Otras líneas de investigación se han centrado en detoxificar el gluten a través de diferentes técnicas: empleo de proteasas orales, como las propil-endopeptidasas de origen fúngico o bacteriano o la combinación de enzimas como la latiglutenasa (ALV003); adición de probióticos en la elaboración del pan, como *Lactobacillus* que posee peptidasas capaces de hidrolizar el gluten; utilización de harinas tratadas con proteasas durante la fermentación del trigo; incubación de gliadina con anticuerpos tTG y metil-ester-lisina; o tratamiento térmico con microondas (Vaquero *et al.*, 2018; Yoosuf y Makharia, 2019).

Es importante reseñar, que ninguna de estas técnicas alternativas ha alcanzado la fase III de los ensayos clínicos o están en estado preclínico.

Respecto a la prevención primaria de la celiaquía parece existir un período protector entre los 4 y 6 meses de edad, o al menos se asocia con un retraso en la aparición de los síntomas. La ESPGHAN no recomienda introducir glu-

ten antes de las 17 semanas ni después de las 26 semanas de edad, coincidiendo con el período de lactancia materna. La prevención secundaria se centra en el diagnóstico temprano y en la rápida instauración del tratamiento, para lo que el cribado masivo es de gran utilidad. Finalmente, la adherencia a la dieta libre de gluten se puede considerar prevención terciaria y reduce las complicaciones a largo plazo (Vriezinga *et al.*, 2015). Otra vía de investigación en la prevención es la modificación de la biota intestinal de individuos de alto riesgo genético, con el suplemento de probióticos. Si resulta exitosa esta línea de investigación, apoyaría la idea de que la alteración en la funcionalidad de la microbiota es una de las causas del desarrollo de la celiaquía y que controlar la desregulación de la microbiota puede prevenir el desarrollo de celiaquía (Tye-Din *et al.*, 2018).

### **2.3.4 Información y protección de la salud de los consumidores**

Como se ha comentado, determinados componentes o ingredientes alimentarios pueden provocar reacciones de hipersensibilidad en algunas personas, con el consiguiente riesgo para su salud. Para lograr un alto nivel de protección de la salud de los consumidores y garantizar su derecho a la información, se debe velar para que los consumidores estén debidamente informados respecto a los alimentos que consumen. Este es uno de los objetivos de la legislación alimentaria que establece la obligatoriedad de ofrecer información sobre la presencia en los alimentos de sustancias o productos con efectos alergénicos o de hipersensibilidad no alérgica demostrados científicamente para que los consumidores, especialmente aquellos que sufran una reacción de hipersensibilidad alimentaria, elijan con conocimiento de causa las opciones que sean seguras para ellos. En concreto, el Reglamento (UE) n.º 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor exige mencionar en el etiquetado y destacar mediante una composición tipográfica diferenciada determinados ingredientes o coadyuvantes que causen alergias o intolerancias. La Tabla 23 muestra las 14 sustancias o productos que causan reacciones de hipersensibilidad alimentaria contemplados en la citada norma, con indicación de las principales proteínas alergénicas que contienen.

**Tabla 23.** Sustancias y productos que causan reacciones de hipersensibilidad alimentaria a declarar en el etiquetado.

Alimento	Principales Proteínas Alérgicas
Cereales con gluten	Gliadina (Tri a 19 y Tri a 20) Glutenina (Tri a 26 y Tri a 36)
Crustáceos	Pen a 1 (tropomiosina)
Huevo	Ovomucoide (Gal d 1) Ovoalbúmina (Gal d 2) Ovotransferrina (Gal d 3) Lisozima (Gal d 4) $\alpha$ -livetina (Gal d 5)
Pescado	Parvalbúmina
Cacahuete	Ara h 1 (7S seed storage globulina) Ara h 2 (2S albúmina) Ara h 3 (11S seed storage globulina)
Soja	Gly m Bd 30 K Gly m Bd 60 K Gly m Bd 28 K
Leche	B-lactoglobulina (Bos d 5) Caseína (Bos d 8) $\alpha$ -lactalbúmina (Bos d 4)
Frutos de cáscara <sup>1</sup>	Pru du 6 (11S globulina) de almendra Ber e 1 (2S albúmina) de nueces de Brasil Ana o 1 (vicilina) y Ana o 2 (11S globulina) de anacardo Cor a 1 (PR-10/Bet v 1 homólogo) de avellana
Apio	Api g 1 (PR-10/Bet v 1 homólogo)
Mostaza	Sin a 1 (2S albumin) Sin a 2 (11S globulin)
Granos de sésamo	Ses i 6, Ses i 7 (11S globulina) Ses i 1, Ses i 2 (2S albúmina)
Dióxido de azufre y sulfitos <sup>2</sup>	
Altramuces	Lup a (11S globulina) Lup a 1 (7S globulina)
Moluscos	Tropomiosina (Myt e 1)

<sup>1</sup> Frutos de cáscara: almendras, avellanas, nueces, anacardos, pacanas, nueces de Brasil, alhóncigos, nueces de macadamia.

<sup>2</sup> Dióxido de azufre y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/litro en términos de SO<sub>2</sub> total, para los productos listos para el consumo o reconstituidos conforme a las instrucciones del fabricante.

Fuente: Elaboración propia adaptada del Reglamento (UE) n.º 1169/2011, Alves *et al.* (2016) y Ross *et al.* (2018).

La presencia de las sustancias o productos recogidos en la Tabla 23 es también de declaración obligatoria en alimentos que se presenten sin envasar al consumidor final y colectividades, en los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, en los envasados por los titulares del comercio al por menor para su venta inmediata en un establecimiento de su propiedad, y en los contemplados en los supuestos anteriores y ofrecidos para la venta mediante comunicación a distancia (Reglamento (UE) n.º 1169/2011; Real Decreto 126/2015).

Por otro lado, el Reglamento (CE) n.º 828/2014 establece las declaraciones autorizadas sobre la ausencia o presencia reducida de gluten en los alimentos y sus condiciones. Así, se podrá utilizar la declaración “sin gluten” cuando el contenido máximo de gluten en el producto final sea de 20 mg/kg, y “con bajo contenido en gluten” cuando el contenido en gluten sea inferior a 100 mg/kg.

El etiquetado precautorio de alérgenos, desarrollado bajo el marco del artículo 36 del Reglamento (UE) n.º 1169/2011, es la herramienta para gestionar el riesgo de la presencia no intencionada de alérgenos alimentarios. Sin embargo, el uso de la mención preventiva “puede contener” sin la suficiente evidencia científica que fije una dosis de referencia protectora, ha provocado la falta de credibilidad por el consumidor alérgico (DunnGalvin *et al.*, 2015). Por este motivo, la CE puede desarrollar actos de ejecución para cubrir este aspecto de la información voluntaria relativa a la posible presencia no intencionada en el alimento de sustancias o productos que causen alergias o intolerancias, entre otros aspectos.

Por el contrario, la no declaración de alérgenos y gluten constituye un asunto de gran preocupación, siendo el origen de muchas alertas alimentarias y retirada de alimentos. Así lo pone de manifiesto el informe de 2018 del Sistema de Alertas Rápidas para Alimentos y Piensos (*Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF), con 149 notificaciones (un aumento del 31% respecto al anterior informe), siendo la leche, el gluten y los frutos secos las sustancias alergénicas más notificadas, y los platos preparados y los *snacks* los alimentos más implicados. La mayoría de las notificaciones informadas se debían a errores en el etiquetado debido a la no declaración de alérgenos (UE, 2019). De la misma manera, en la memoria de 2018 del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI), los defectos del etiquetado relacionados principalmente con la ausencia de declaración de alérgenos supuso el 56% de las notificaciones de alerta dentro del grupo de “otros peligros”, destacando los alérgenos como segunda causa de alertas alimentarias tras los microorganismos patógenos (AESAN, 2019b).

La revisión de Do *et al.* (2018) sobre estudios de prevalencia de la no declaración de alérgenos (leche, huevo, gluten, cacahuete, avellana y soja) en productos comercializados, así como la de prevalencia de alérgenos en productos con etiquetado precautorio, todos ellos analizados mediante la técnica ELISA. La proteína de leche fue el alérgeno que generó más alertas, con una prevalencia de no declaración entre el 16 y el 31% en estudios de todo el mundo. Respecto al huevo, la FDA reportó una prevalencia del 3,1-7,5% entre los años 2000-2014 y sobre el gluten, la UE informó de una prevalencia entre el 17-19% durante

los años 2011-2014. Los autores manifestaron la necesidad de más estudios para establecer la aparente relación entre el uso del etiquetado precautorio y la presencia de alérgenos. Los resultados también asociaron ciertos productos con una mayor prevalencia de alérgenos no declarados, como es el caso de la proteína de leche no declarada en chocolate negro con una prevalencia que va desde el 0,8 hasta el 14,8% según los diferentes estudios.

### 2.3.5 Métodos analíticos de detección de alérgenos en alimentos

La información contenida en la etiqueta sobre la presencia de alérgenos en los alimentos supone un elemento indudable de protección al consumidor. No obstante, existe la posibilidad de que en el alimento estén presentes “alérgenos ocultos”, es decir, trazas de proteínas alergénicas que pueden comprometer la salud del consumidor alérgico. Por lo tanto, es necesario tanto en la industria alimentaria como a nivel del control oficial disponer de métodos analíticos que permitan detectar en los alimentos, de manera específica y sensible, pequeñas cantidades de sustancias causantes de reacciones de hipersensibilidad alimentaria, a pesar del efecto matriz o del tratamiento térmico a que se haya sometido el alimento. Actualmente, se dispone de métodos de detección y cuantificación de alérgenos alimentarios directos, que detectan proteínas, e indirectos, basados en la detección de ADN (Tabla 24).

**Tabla 24.** Métodos analíticos directos e indirectos para la detección y cuantificación de alérgenos en los alimentos.

<b>Directos: detección de proteínas</b>	Inmunoquímicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ELISA</li> <li>- LFD</li> <li>- Técnicas RAST y EAST</li> <li>- <i>Immunoblotting</i></li> <li>- <i>Dot-blot</i></li> <li>- RIE</li> <li>- Biosensores de proteínas</li> <li>- <i>Microarrays</i> de proteínas</li> </ul>
	Espectrometría de masas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PCR-ELISA</li> <li>- PCR en tiempo real</li> <li>- MLPA</li> </ul>
<b>Indirectos: detección de ADN</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PCR en tiempo real-HRM</li> <li>- PCR anidada en tubo único</li> <li>- Biosensores de ADN</li> <li>- Aptasensores</li> <li>- <i>Microarrays</i> de ADN</li> </ul>

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*. LFD: *Lateral Flow Devices*. RAST: *Radio-allergosorbent*. EAST: *Enzyme-allergosorbent*. *Dot-Blot*: *Dot-immunoblotting*. PCR: *Polymerase Chain Reaction*. MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*. HRM: *High Resolution Melting*.

Los métodos **directos** permiten la detección real de las proteínas alergénicas de manera específica y sensible mediante técnicas inmunológicas o no inmunológicas.

En general, los métodos **inmunológicos** se basan en la unión específica entre los epítomos de la molécula diana (el alérgeno) y una inmunoglobulina específicamente diseñada para ese analito.

#### **2.3.5.1. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)**

La técnica de inmunoensayo ELISA es una de las más utilizadas para la identificación y/o cuantificación de analitos de naturaleza proteica. En función de la manera en que se produzcan las interacciones antígeno-anticuerpo, los ensayos ELISA pueden clasificarse en cuatro principales categorías.

Diferentes casas comerciales han desarrollado kits ampliamente utilizados en la industria alimentaria. Normalmente, son del tipo ELISA sándwich, donde el antígeno queda inmovilizado entre dos anticuerpos, uno de captura y otro de detección, que se unirán a dos epítomos distintos de un mismo antígeno. Así, un primer anticuerpo que tapiza la placa de pocillos retiene los antígenos presentes en la muestra de alimento. Los antígenos capturados son detectados por un segundo anticuerpo, conjugado con una enzima que convierte al sustrato en un producto detectable y medible.

Por otro lado, el tipo ELISA competitivo o de inhibición es más adecuado para la detección de antígenos presentes en muy bajas cantidades. En esta variante, se utiliza un antígeno de referencia que compite con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo primario. Para ello, se incuba el alérgeno de una muestra con un anticuerpo no marcado. A continuación, el complejo formado se transfiere a un pocillo con una cantidad de antígeno de referencia inmovilizado en la fase sólida y se produce la competencia. Si en la muestra no hay antígenos, el anticuerpo mostrará afinidad por el antígeno de referencia. Posteriormente, se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al complejo anticuerpo primario-antígeno de referencia, y la enzima al reaccionar con el sustrato proporcionará un producto coloreado (Figura 11). En este caso, la absorbancia medida es inversamente proporcional a la concentración de alérgeno en la muestra (Poms *et al.*, 2004, Holck *et al.*, 2011).

El ELISA es una técnica cuantitativa o semicuantitativa y es la más empleada para el control de alérgenos en alimentos debido a su alta sensibilidad (hasta 0,2 mg/kg), rapidez, fiabilidad y sencillez de manejo, ya que no requiere personal altamente cualificado ni un equipo muy sofisticado. Además, permite el análisis simultáneo de varias muestras (Poms *et al.*, 2004). Una desventaja es que el ensayo puede ser relativamente largo y resultar caro si se procesa un número bajo de muestras. Además, los resultados de diferentes kits comerciales pueden ser variables, puesto que los anticuerpos usados reconocen epítomos distintos. Los

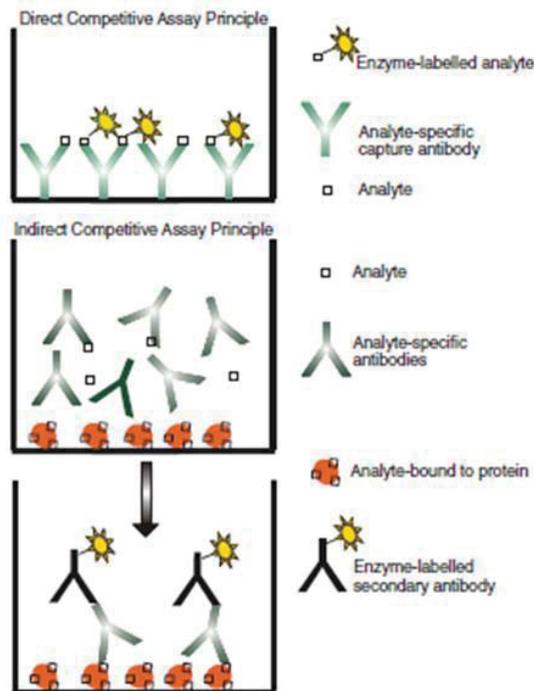


Figura 11. ELISA competitivo (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009)

resultados también se pueden ver afectados por problemas de reactividad cruzada, efecto matriz y por el procesamiento del alimento (Costa *et al.*, 2016).

Para la detección de proteína de leche, algunos de los kits comercializados detectan diferentes proteínas de la leche (caseína,  $\beta$ -lactoglobulina), mientras que otros detectan proteína total de leche con límites de detección entre 0,1 y 5 mg/kg. Para ciertos alimentos, como productos lácteos fermentados, los epítomos se pueden hidrolizar manteniendo su potencial alergénico. Estos epítomos pueden ser infraestimados o incluso no ser detectados por los ELISA sándwich. En estos casos, los ELISA competitivos se comportan satisfactoriamente detectando niveles por debajo de 5 mg/kg (EFSA, 2014).

En el caso de la proteína de huevo, también existen numerosos kits comerciales con rendimientos variables y ciertas limitaciones. Las dianas suelen ser las proteínas ovomucoide y ovoalbúmina, juntas o por separado, y las proteínas de huevo totales, con unos límites de detección entre 0,08 y 0,6 mg/kg y límites de cuantificación entre 0,3 y 1 mg/kg. Como consecuencia del efecto matriz o de la reactividad cruzada con la proteína ovomucoide de otros huevos de aves, se pueden dar falsos negativos y falsos positivos. Aunque de mayor trascendencia para la detección de los alérgenos del huevo son los efectos originados por el proceso térmico. El tratamiento térmico reduce el reconocimiento de las proteínas nativas por parte de los anticuerpos y disminuye la solubilidad de las proteínas (EFSA, 2014).

Para la detección de gluten en alimentos, los dos ELISA sándwich desarrollados se emplean para detectar proteínas alergénicas en trigo, avena y cen-

teno. El kit de ELISA basado en el anticuerpo mAb R5 detecta prolamina en esos tres cereales con una exactitud que depende de la matriz alimentaria, mientras que el kit ELISA basado en el mAb 401/21 reacciona principalmente frente a glutenina de alto peso molecular y  $\omega$ -5-gliadina. Se ha alcanzado un límite de detección de 0,8 mg/kg de gliadina en trigo, cebada y centeno con un ELISA tipo sándwich doble anticuerpo (EFSA, 2014).

### 2.3.5.2 Tiras de Flujo Lateral (LFD, Lateral Flow Devices)

Una alternativa al ELISA es el ensayo mediante tiras LFD, que no deja de ser una versión simplificada del mismo. Consiste en una membrana de nitrocelulosa, nailon o polivinildifluorido en la que se inmoviliza el agente específico para el analito (anticuerpo o antígeno). Posteriormente, se deposita el reactivo de detección, normalmente un anticuerpo (marcado con partículas de oro coloidal o látex, o con una enzima), en la almohadilla de conjugado y seguidamente la muestra. Ambos reaccionarán inmunológicamente según se vayan desplazando por la membrana. El complejo analito-reactivo de detección es capturado por el agente específico inmovilizado en una banda transversal de la tira, emitiendo un color proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. Existe una segunda membrana con anticuerpos específicos que se unirán al anticuerpo marcado con oro coloidal a modo de control de la migración sobre la tira (Figura 12). También se puede presentar bajo el formato de inmunoensayo de inhibición competitiva.

Las tiras reactivas (*dipstick test*) son similares al LFD, pero sin fase móvil. Los anticuerpos de captura se encuentran inmovilizados en un extremo de la tira, donde son puestos en contacto con el alérgeno de la muestra. Tras la incubación, se añaden los anticuerpos de detección, que normalmente van marcados con una enzima que reacciona con el sustrato para formar un producto coloreado (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009; Holck *et al.*, 2011).

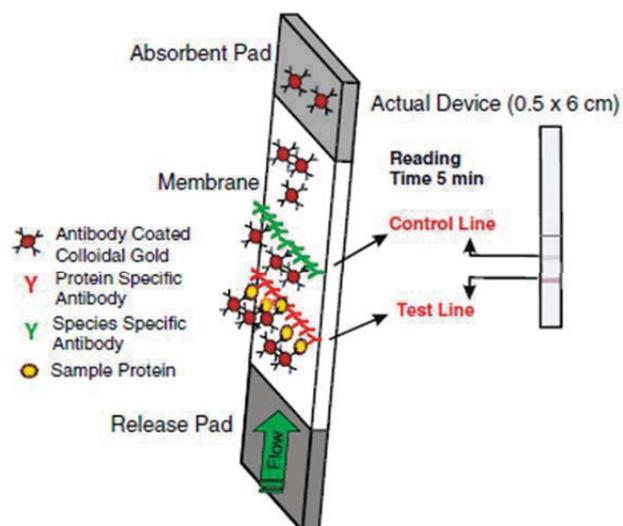


Figura 12. Diagrama de un dispositivo de flujo lateral (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009)

La principal utilidad de estos sistemas es actuar como indicadores de contaminación en empresas alimentarias, debido a su precio económico, su fácil manejo sin necesidad de instrumentación, portabilidad, rapidez y sensibilidad en la obtención de resultados (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

Actualmente, existen LFD y tiras reactivas comercializadas capaces de detectar gliadina y proteínas alergénicas en huevo, leche, cacahuete, almendra, avellana, crustáceos y moluscos con unos límites de detección entre 1 y 25 mg/kg (Holck *et al.*, 2011).

Los resultados son interpretados visualmente ya que dan solo un valor cualitativo o semicuantitativo, aunque actualmente se pueden cuantificar los resultados inmunocromatográficos gracias al desarrollo de detectores portátiles (incluso aplicaciones para *smartphones*) basados en medidas de densidad óptica, magnética y fluorescencia (Urusov *et al.*, 2019).

### 2.3.5.3 Técnica Radio-alergosorbent (RAST) y Técnica Enzyme-allergosorbent (EAST)

Los test de inhibición RAST y EAST, ampliamente utilizados en el diagnóstico clínico de las alergias alimentarias, también se han utilizado para la detección de alérgenos en alimentos. En estas técnicas, un antígeno alergénico inmovilizado en una fase sólida se une a una IgE específica humana. Los antígenos de la muestra inhiben la unión del antígeno inmovilizado a la IgE (inmunoensayo competitivo). Un segundo anticuerpo anti-IgE marcado con un isótopo (RAST) o una enzima (EAST) y el sustrato, emitirán radioactividad o un producto coloreado, respectivamente, cuya intensidad será inversamente proporcional a la cantidad de alérgeno presente en la muestra de alimento (Figura 13). Para la cuantificación se emplea un contador gamma que mide la radioactividad o un espectrofotómetro que mide la absorbancia (Poms *et al.*, 2004; Kirsch *et al.*, 2009).

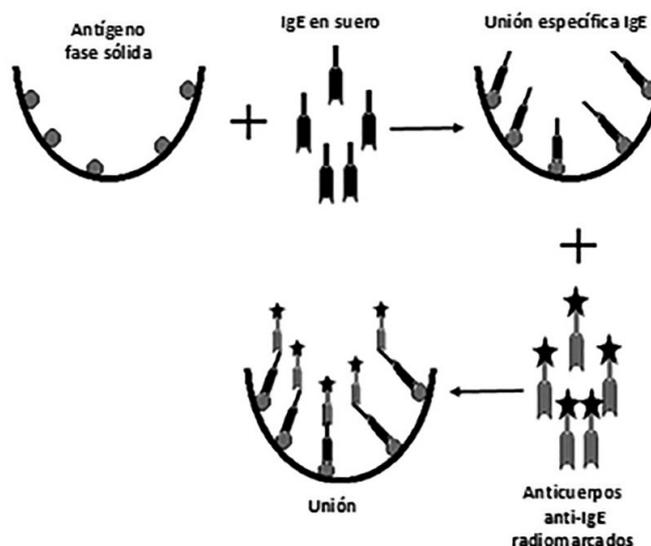


Figura 13. Técnica Radio-allegosorbent (RAST) (Iqbal *et al.*, 2018)

No obstante, el uso comercial de las técnicas RAST y EAST para la detección de alérgenos en la industria alimentaria ha sido limitado, ya que la falta de disponibilidad de sueros de pacientes alérgicos humanos y la gran variabilidad en la producción de IgE dificulta la estandarización de estas técnicas. El uso de radioisótopos es otra de sus desventajas (Poms *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2009).

#### **2.3.5.4 Immunoblotting**

Esta técnica inmunoquímica, por la que se consigue la separación de las proteínas del alimento, está basada en el uso de un gel de electroforesis de poliacrilamida (PAGE), en presencia del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS). El SDS desnaturaliza las proteínas y les confiere una carga negativa. Las proteínas son separadas según sus pesos moleculares (gel monodimensional) o de acuerdo a su peso molecular y punto isoeléctrico (gel bidimensional). Una vez separadas, son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o polivinilpirrolidona para su inmunodetección por anticuerpos marcados con enzimas. Los alérgenos detectados aparecen como bandas individuales de proteína (gel 1D) o como manchas individualizadas (gel 2D) (Poms *et al.*, 2004). El *immunoblotting* puede ser útil como test de confirmación de alérgenos en alimentos, o para evaluar la especificidad de anticuerpos y caracterizar IgE de individuos alérgicos (Holck *et al.*, 2011).

#### **2.3.5.5 Dot-immunoblotting (Dot-blot)**

Otra técnica cuya utilidad se planteó para la detección de alérgenos alimentarios fue el *dot-blot*, por ser una prueba de detección sencilla y económica. En esta técnica, una gota con los extractos de proteína de la muestra, se deposita en una membrana de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno y se incuba junto con un anticuerpo específico conjugado con una enzima. Si se produce la unión entre ellos (antígeno diana-anticuerpo conjugado) se observará una mancha coloreada después de la interacción enzima-sustrato. La intensidad de las manchas es proporcional a la cantidad de antígeno, por lo que la *dot-blot* es una prueba semicuantitativa (Poms *et al.*, 2004).

#### **2.3.5.6 Rocket Inmunolectoforesis (RIE)**

En esta técnica se añaden los anticuerpos a un gel que se somete a un campo eléctrico. Los antígenos a investigar migran conforme a su movilidad electroforética hasta que el complejo anticuerpo-antígeno precipita en forma de cono o cohete. La altura del cono es proporcional a la cantidad de alérgeno, por lo que los resultados se pueden cuantificar.

La RIE no es una técnica muy utilizada para detectar alérgenos en alimentos debido a lo laborioso que es la preparación del gel y los procedimientos de inmunotinción (Poms *et al.*, 2004).

### 2.3.5.7 Biosensores de proteínas

La mayoría de los biosensores utilizados en el análisis de alérgenos alimentarios son inmunosensores, siendo la molécula diana una proteína alergénica o un anticuerpo. Los biosensores consisten en una molécula diana inmovilizada sobre la superficie de un chip que funciona como receptor. La interacción entre este elemento de reconocimiento y el analito produce unas variaciones físico-químicas, que un transductor interpreta y convierte en una señal analizable por un sistema de procesamiento de señal. Se obtiene un resultado semicuantitativo o cuantitativo proporcional a la concentración del analito (Alves *et al.*, 2016).

Según el tipo de transductor, los biosensores se pueden clasificar en ópticos, electroquímicos y electromecánicos o piezoeléctricos (Pilolli *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2016; de la Cruz *et al.*, 2017):

Los biosensores representan la alternativa a los ELISA más prometedora y, debido a su sencillez, rapidez y viabilidad para su automatización, tienen un alto potencial para convertirse en una técnica de análisis directo y a tiempo real en la cadena alimentaria (Alves *et al.*, 2016).

### 2.3.5.8 Microarrays de proteínas

La principal característica de la tecnología *microarray* es la detección simultánea de múltiples analitos en una muestra. Los *microarrays* contienen elementos de reconocimiento biomolecular específicos, como pueden ser anticuerpos específicos frente a ciertos alérgenos o marcadores proteicos de alimentos. Estos anticuerpos se inmovilizan en diminutos microchips mediante microimpresión o microestructuración, formando una superficie conocida. El análisis de datos se obtiene con distintos sistemas de lectura y *software* de procesamiento de imágenes. Técnicas como ELISA o LFD se pueden implementar usando plataformas de *microarray* de flujo continuo para su aplicación en análisis múltiple (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

Por el momento es impensable su uso rutinario en la industria alimentaria, pero los *microarrays* son una herramienta prometedora para la detección y cuantificación rápida y simultánea de alérgenos en muestras de pequeños volúmenes.

La **espectrometría de masas** surgió como herramienta confirmatoria para la determinación de los alérgenos en alimentos, ofreciendo la posibilidad de análisis múltiple con una elevada exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Esta tecnología es independiente de la interacción anticuerpo-alérgeno por lo que no se ve afectada por la reactividad cruzada como ocurre en los inmunoensayos. Esto permite la inequívoca identificación y caracterización de las proteínas alergénicas (Monaci y Visconti, 2009; Costa *et al.*, 2016). Además, con las últimas generaciones de espectrómetros de masas, es posible la cuantificación de proteínas alergénicas en los alimentos (Monaci *et al.*, 2018).

Para la cuantificación directa de proteínas intactas se emplea la estrategia proteómica *Top-Down* (de arriba hacia abajo) sin necesidad de digestión previa. Sin embargo, la extrema complejidad de cuantificar proteínas intactas en matrices complejas, como los productos procesados, limita el uso de esta metodología. En contrapartida, la aproximación *Bottom-Up* (de abajo hacia arriba) ha demostrado su idoneidad para la cuantificación de alérgenos en matrices complejas. Ello requiere un paso de digestión enzimática previa de las proteínas aisladas para convertirlas en péptidos. La determinación de la masa de los péptidos obtenidos permite la comparación con las masas teóricas de las diferentes proteínas extraídas de estándares del alérgeno (mapeo de masas peptídicas). En ambos casos, la separación previa de péptidos y proteínas representa un elemento esencial en el análisis proteómico, existiendo dos posibilidades: la electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE) y la cromatografía líquida (LC). Esta última técnica es la de uso más común para el análisis de proteínas alergénicas en alimentos.

Como fuente de ionización, las técnicas de ionización suave por electrospray (ESI) y desorción láser asistida por matriz (MALDI) constituyen la base de la proteómica contemporánea. Por otro lado, los analizadores de masa más especializados desarrollados en los últimos años son los de cuadrupolo (Q), de tiempo de vuelo (TOF) y de confinamiento de iones (IT, *Ion Traps*), Orbitraps y analizadores de resonancia ión-ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR)). La combinación de fuentes iónicas y analizadores de masas constituyen los sistemas de espectrometría de masas híbridos. El acoplamiento de ionización MALDI con los analizadores TOF (para la medición de proteínas intactas o péptidos), y de la ionización ESI con IT y triple Q (para generar un espectro de iones fragmentados) son, junto a los híbridos de TOF (Q-TOF y TOF en tándem), las configuraciones más extendidas en la identificación y cuantificación de alérgenos y biomarcadores peptídicos (Monaci y Visconti, 2009; Costa *et al.*, 2016; Monaci *et al.*, 2018).

A pesar de las ventajas que presenta la espectrometría de masas y la disponibilidad de diferentes métodos, el alto coste de los equipos y su mantenimiento y el requerimiento de personal altamente cualificado, dificulta su aplicación en los análisis rutinarios de control de alérgenos en alimentos. Aun así, se están haciendo esfuerzos para armonizar el método analítico con la espectrometría de masas, sobre todo el basado en el control selectivo de reacción (SRM, *Selection Reaction Monitoring*). Con este objetivo ha surgido el proyecto europeo ThRAII, que se está desarrollando como método de referencia para la detección y cuantificación simultánea de seis alérgenos (leche de vaca, huevo, cacahuete, avellana, almendra y soja) (Mills *et al.*, 2019).

La alternativa a la detección de proteínas alergénicas son los métodos **indirectos**, basados en la determinación de marcadores. Estos métodos implican la extracción de un alérgeno proteico específico o un marcador alergénico que codifica un fragmento de ADN amplificado mediante PCR. Son métodos muy sensibles y específicos y presentan varias ventajas frente a los inmunoensa-

yos: son menos propensos a la reactividad cruzada, les afecta menos el tratamiento térmico del alimento, se obtienen resultados rápidos y tienen un coste moderado (Monaci y Visconti, 2010; Alves *et al.*, 2016). Pueden ser útiles para el análisis confirmatorio cuando no existen métodos inmunológicos adecuados y para el análisis de grupos de alérgenos como pescado, crustáceos y fuentes de gluten (trigo, cebada y centeno) (Holck *et al.*, 2011).

#### **2.3.5.9 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction)**

Esta técnica se basa en la detección de una secuencia específica de ADN de una determinada proteína alergénica. El fragmento de ADN es amplificado por la enzima ADN polimerasa que requiere un par de oligonucleótidos como cebadores (*primers*) para reconocer la secuencia de ADN. La reacción consiste en tres pasos por ciclo de amplificación, determinado cada uno de ellos por una diferente temperatura: desnaturalización de la doble cadena de ADN, hibridación de los cebadores a su secuencia complementaria de ADN molde y extensión de los cebadores por la polimerasa para la síntesis de nuevo ADN. Estos pasos se repiten durante 25-45 ciclos y el producto amplificado se visualiza con una tinción de colorante fluorescente o mediante electroforesis en gel agarosa. El resultado obtenido nos indicará la presencia o ausencia de la secuencia de ADN codificada para el alérgeno en cuestión, es decir, la PCR convencional es una prueba cualitativa (Poms *et al.*, 2004; Holck *et al.*, 2011; Slowianek y Majak, 2011; De la Cruz *et al.*, 2017).

También se contempla la posibilidad de la reacción dúplex de PCR en la que se emplean dos parejas específicas de cebadores para la detección simultánea de dos alérgenos (Slowianek y Majak, 2011).

El uso de la técnica de PCR para la detección de trazas de leche en alimentos es muy limitado, debido al bajo contenido de ADN. Otra de las limitaciones de la PCR es que no detecta la proteína alergénica en cuestión y, por lo tanto, el resultado no se puede asociar a una reacción alérgica. Además, el procesamiento del alimento puede afectar a proteínas y ADN de manera diferente induciendo a resultados erróneos (Poms *et al.*, 2004; Slowianek y Majak, 2011). Para la detección de proteína de huevo también presenta limitaciones relacionadas con el bajo contenido de ADN de los huevos y con el hecho de que el ADN del huevo de gallina no se puede distinguir del ADN de carne de pollo (EFSA, 2014).

#### **2.3.5.10 PCR-ELISA**

Esta técnica combina la alta especificidad de los métodos basados en la detección de ADN con la sencillez y bajo coste de las técnicas ELISA, lo que permite obtener resultados semicuantitativos (Slowianek y Majak, 2011). Su fundamento se basa en amplificar el fragmento de ADN específico de un alérgeno alimentario. El producto amplificado se hibrida a una sonda de ADN ligada a una proteína específica. Esta proteína es reconocida por un anticuerpo marcado con una enzima específica. La concentración de ADN puede

ser cuantificada por la reacción colorimétrica que resulta de la reacción de la enzima con el sustrato (Poms *et al.*, 2004).

#### **2.3.5.11 PCR en tiempo real**

Para obtener resultados cuantitativos se recurre a la PCR en tiempo real, con la que se alcanzan límites de detección comparables a los métodos inmunológicos, lo que proporciona unas interesantes aplicaciones en los análisis de rutina (Monaci y Visconti, 2010).

En esta técnica se utiliza una sonda con un fluoróforo que permite la lectura de los datos a medida que avanza la PCR. La señal de fluorescencia medida por el termociclador es proporcional a la cantidad de ADN replicado (Holck *et al.*, 2011). Estos mismos autores recogen en su trabajo de revisión la variedad de kits comerciales disponibles tanto para PCR en tiempo real como para PCR convencional. El número de kits de PCR-ELISA disponible en el mercado es bastante más reducido.

De la misma manera que la PCR dúplex, la PCR en tiempo real multiplex consigue amplificar varios fragmentos de ADN simultáneamente mediante la aplicación de varias parejas de cebadores, consiguiendo ahorro de tiempo y recursos, si bien se debe prestar especial atención al diseño de las parejas de cebadores para evitar que hibriden entre ellos y formen dímeros de cebadores que amplifiquen a expensas del ADN molde (Holck *et al.*, 2011; Slowianek y Majak, 2011).

Para la detección y cuantificación de ADN en cereales que contienen gluten se comercializan varios kits de PCR en tiempo real. Las sondas TaqMan se han utilizado con éxito en diferentes kits. Por ejemplo, para la detección de trigo y cebada en productos altamente procesados (pan, galletas y pasteles), se ha obtenido un límite de detección de 1 genoma y 10 copias de genoma, que se corresponden a 50 y 150 pg de ADN, en trigo y cebada respectivamente. También se han alcanzado límites de detección de 2,5 mg/kg de trigo en matrices vegetales y 5 mg/kg de trigo en productos cárnicos (EFSA, 2014).

#### **2.3.5.12 Amplificación de sondas dependiente de ligadura múltiple (MLPA, Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)**

Esta técnica de biología molecular conlleva un paso previo de unión que se produce entre dos hemi-sondas adyacentes diseñadas para una secuencia de ADN diana determinada, que está presente en la muestra. Una vez que las dos hemi-sondas han hibridado se produce la unión y serán las sondas ligadas las que amplifiquen durante la reacción PCR. Uno de los cebadores contiene un fluoróforo que permite su detección mediante electroforesis capilar y la cantidad de producto de PCR medida es proporcional a la cantidad de ADN diana presente en la muestra. El sistema es más flexible que la PCR en tiempo real y se pueden emplear más pares de hemi-sondas que amplificarán con el mismo par de cebadores, lo que permite ampliar el rango de secuencias diana (Monaci y Visconti, 2010; Costa *et al.*, 2016; De la Cruz *et al.*, 2017).

Diferentes estudios han demostrado la adecuada sensibilidad y especificidad de la MLPA, por ejemplo, el llevado a cabo por Ehlert *et al.* (2009) para la detección simultánea de 8 frutos secos y semillas de sésamo, o el desarrollado para la detección de especies alergénicas de pescado, marisco, crustáceos y cefalópodos (Unterberger *et al.*, 2014). Otro estudio detectó 8 ingredientes alergénicos mediante una 10-plex MLPA cuantitativa (Mustorp *et al.*, 2011).

#### **2.3.5.13 PCR en tiempo real acoplada con Fusión de Alta Resolución**

El análisis de fusión de alta resolución (HRM, *High Resolution Melting*,) se ha aplicado a la identificación y diferenciación de especies relacionadas filogenéticamente, organismos modificados genéticamente y alérgenos alimentarios. Es un método de análisis post-PCR utilizado para identificar la variación en las secuencias de ácido nucleico. La técnica comienza con una PCR en tiempo real que amplifica la secuencia de ADN y, a la vez, son añadidos colorantes fluorescentes (SYBR Green o SYTO Dye). Estos colorantes se unen específicamente a la doble cadena de ADN, con la ventaja de añadirse en alta concentración y así disminuir la probabilidad de amplificaciones no específicas o la inhibición de la PCR. Durante la fusión de los fragmentos se van a detectar cambios sutiles de fluorescencia que se corresponden con pequeñas variaciones como la del cambio de una base nitrogenada (Costa *et al.*, 2016).

En el campo de los alérgenos alimentarios la HRM se ha utilizado para la detección de almendras y su diferenciación de otros frutos de los árboles del género *Prunus* (Costa *et al.*, 2012) o, más recientemente, para diferenciar trigo de otros cereales que también contienen gluten (Martín-Fernández *et al.*, 2016).

#### **2.3.5.14 PCR Anidada en Tubo Único (STNPCR, Single Tube Nested-PCR)**

La PCR anidada se ha usado normalmente para aumentar la sensibilidad y reducir la amplificación de las dianas de ADN no específicas. Esta técnica se basa principalmente en dos amplificaciones de PCR, donde la primera reacción produce fragmentos de ADN extensos que servirán de ADN molde para la segunda reacción. Para evitar el problema de la contaminación se ha combinado el uso de dos pares de cebadores anidados (externo e interno) con temperaturas de hibridación diferentes, acoplados a una reacción de PCR en tiempo real en un único tubo cerrado. Al hibridarse los cebadores a diferentes temperaturas, se originan dos fragmentos de ADN específicos por lo que aumenta la especificidad de la reacción. Por el momento, se han realizado pocos estudios de esta técnica para la detección y cuantificación de alérgenos alimentarios (Costa *et al.*, 2016).

#### **2.3.5.15 Biosensores de ADN**

Aunque en la tecnología de los biosensores se han empleado principalmente anticuerpos, la molécula diana inmovilizada sobre la superficie del sensor también puede ser un fragmento de ADN. Un biosensor de ADN o genosensor se basa en

la hibridación de dos cadenas complementarias: un elemento de reconocimiento que es una secuencia monocatenaria de oligonucleótidos, conocida como sonda, y una secuencia complementaria (ADN o ARN), denominada diana. Como en el caso de los inmunosensores, la interacción resultante se obtiene a través de un transductor que produce una señal medible (Costa *et al.*, 2016).

Se han utilizado principalmente en el campo de la investigación. Así, Sun *et al.* (2012) desarrollaron un biosensor electroquímico de ADN para detectar el alérgeno de cacahuete *Ara h1* en una bebida de cacahuete, mientras que Martín-Fernández *et al.* (2016) también utilizaron un genosensor electroquímico para detectar y cuantificar la presencia de gluten, con un límite de detección de 10 mg/kg de trigo en harina de arroz.

La utilización de genosensores podría llegar a convertirse en una alternativa efectiva para la detección de secuencias específicas, principalmente por su sencillez, automatización, bajo coste y alta selectividad (Costa *et al.*, 2016).

#### **2.3.5.16 Aptasensores**

La afinidad y especificidad de los anticuerpos por sus moléculas diana les hacen idóneos en su aplicación como biosensores, pero presentan algunas desventajas como su producción *in vivo* y su corta vida. Para dar solución a estas limitaciones, han aparecido recientemente los aptasensores o sondas de reconocimiento molecular de origen sintético con las características de afinidad y especificidad requeridas. Los aptámeros son una cadena sencilla de oligonucleótidos (de ADN o ARN) sintetizados químicamente para una diana específica, que se obtienen por un proceso de selección *in vitro* mediante la técnica de Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX, *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*) (Alves *et al.*, 2016).

Hay poca información disponible en la literatura científica sobre esta área emergente en el campo de la detección de los alérgenos alimentarios. A este respecto, un grupo de científicos belgas ha trabajado en la detección de lisozima y *Ara h1* (Tran *et al.*, 2010, 2013) y, más recientemente, científicos españoles han publicado trabajos sobre la detección de gliadina en alimentos libres de gluten mediante esta metodología analítica (Amaia-González *et al.*, 2014, 2015).

#### **2.3.5.17 Microarrays de ADN**

También conocidos como chips de ADN o biochips, los *microarrays* de ADN constituyen una poderosa herramienta para la detección simultánea de secuencias múltiples de ADN y análisis multimuestras. Las sondas específicas son inmovilizadas en una superficie sólida por diferentes técnicas y reconocen los amplicones de PCR complementarios marcados con un fluoróforo. Las señales fluorescentes son leídas por un escáner de fluorescencia a la longitud de onda apropiada. Es una técnica cualitativa y útil para un rápido cribado y

aunque se han desarrollado *microarrays* basados en oligonucleótidos o ácidos peptidonucleicos para varios alérgenos, su utilización se centra principalmente en el campo de la investigación (Rossi *et al.*, 2006; Bettazzi *et al.*, 2008).

En resumen, los métodos analíticos más utilizados para la detección de alérgenos en alimentos son los inmunoquímicos ELISA y LFD, la espectrometría de masas y la PCR en tiempo real. En la Tabla 25, se recopilan los proveedores que suministran tests comerciales de ELISA, LFD y PCR para las tres sustancias objeto de nuestro estudio.

**Tabla 25.** Proveedores de kits (ELISA, LFD y PCR) para alérgenos alimentarios.

Alimento	Alérgeno	Tipos de kits y proveedores		
		ELISA	LFD	PCR
Huevo		a, b, c, d, g, m, o, q, s	a, b, c, g, m, s	r
	Lisozima	a, c	-	-
	Parvalbúminas	c, d, m	M	a
Cereales	Gliadina	a, b, o, s	a, b	-
	Gluten	c, e, f, g, h, q	a, b, c, e, f, g, h, m, s	a, p, q
Leche		a, b, c, d, g, m, o	a, c, g, m	r
	B-lactoglobulina	a, b, c, e, f, o, s	c, s	-
	caseína	a, b, c, d, e, f, m, o, q	c, e, f, s	-

(a) R-Biopharm AG; (b) Neogen Corporation; (c) Romer Labs®; (d) Biocheck Ltd; (e) Crystal Chem; (f) Morinaga; (g) Cosmo Bio USA; (h) ELISA Technologies Inc; (m) Elution Technologies; (o) ELISA Systems; (p) BIOTECON Diagnostics; (q) 4LAB DIAGNOSTICS srl; (r) Kogebiotech; (s) Zeulab.

Fuente: Elaboración propia adaptada de Senyuva *et al.* (2019).

### 2.3.6 Validación de los métodos analíticos y criterios de aceptación

Para garantizar la fiabilidad de las medidas analíticas, un laboratorio debe implementar un sistema de control de la calidad. Normalmente, este sistema se gestiona bajo la base de la Norma ISO 17025, que especifica el uso de métodos validados, materiales de referencia y participación en ensayos interlaboratoriales (Monaci y Visconti, 2010).

La validación del método es un componente esencial para que un laboratorio consiga resultados analíticos fiables y comparables entre laboratorios. El compendio de guías publicado por Thompson *et al.* (2002), constituye un protocolo armonizado de gran utilidad para la realización de estos estudios. En este documento se recogen los parámetros que debe contemplar un laboratorio para la validación de un método: aplicabilidad, selectividad, calibración y linealidad, rango de trabajo, límites (de detección y cuantificación), exactitud, sensibilidad, robustez, incertidumbre de medida y efecto matriz.

Estas directrices abordan validación de métodos de una manera general, pero no dan respuesta a aspectos sin resolver en el análisis de alérgenos, como

los materiales de referencia, métodos de fortificación o elección de matrices. Estas carencias se intentaron solventar con la publicación de la guía para la validación de métodos ELISA cuantitativos para alérgenos alimentarios (Abbott *et al.*, 2010). Aparte de complementar aspectos de los parámetros de validación expuestos por Thompson *et al.* (2002), la guía recoge criterios de aceptación y trata ciertas limitaciones en el análisis de alérgenos (materiales de referencia, métodos de fortificación y matrices alimentarias). Define criterios de aceptación como los límites numéricos, rangos o cualquier otra medida de aceptación del resultado analítico, que todo método de análisis de alérgenos alimentarios debe considerar apto para su uso previsto. Así, por ejemplo, el criterio de aceptación que propone para el porcentaje de recuperación de las muestras fortificadas o enriquecidas (cantidad conocida de alérgeno alimentario añadido en el producto final tras el procesado) es entre el 80% y 120%, y para las muestras adicionadas o procesadas (cantidad conocida de alérgeno alimentario incorporado a la muestra antes de su procesado) entre el 50% y 150%.

La mejor fuente de información sobre el rendimiento del método (porcentaje de recuperación del material de referencia añadido) para la detección de alérgenos la proporcionan las muestras adicionadas. Con este planteamiento, se consigue reproducir las condiciones a las que se expone la matriz alimentaria durante el procesado. Sin embargo, su obtención puede ser dificultosa y costosa, por lo que se suelen usar muestras fortificadas.

El desarrollo de materiales de referencia (MR) y, preferiblemente, de materiales de referencia certificados (MRC) en diferentes matrices es esencial en la detección de alérgenos alimentarios. Su uso permite demostrar que la técnica analítica realmente detecta al alérgeno y evaluar el porcentaje de recuperación, es decir la exactitud del método.

Los MR son sustancias suficientemente homogéneas y estables con propiedades bien caracterizadas, que se consideran idóneas para su uso en el desarrollo de métodos y validación o para pruebas de rendimiento del método. Los MRC, además, poseen documentación emitida por un órgano autorizado, en la que al valor asignado le acompaña una incertidumbre asociada y una trazabilidad metrológica (ISO 33:2015). El principal problema en la cuantificación de alérgenos por métodos inmunológicos o basados en ADN es la falta de MRC, ya que los MR no permiten una comparabilidad de resultados tan fiable al no poseer tanta calidad metrológica como los MRC.

El mayor inconveniente para la producción de MR es cómo el procesado del alimento altera la proteína alergénica, tanto su estructura, como su solubilidad, contenido o reactividad. En esta línea, el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, *National Institute of Standards and Technology*) de EE. UU. y el Instituto de Materiales y Medidas de Referencia (IRMM, *Institute for Reference Materials and Technology*) de la CE, llevan años trabajando para producir MR para alérgenos de alimentos. El Grupo de Trabajo de Alérgenos en Alimentos de la Asociación Internacional de Monitoreo y Aseguramiento de

la Calidad en la Cadena de Suministro Total de Alimentos (MoniQA), también ha trabajado en la producción de MR procesados con el huevo en polvo y leche desnatada en polvo proporcionado por el NIST. Actualmente, se dispone de varios materiales de referencia: para la detección de proteína de leche, el NIST SRM 1549 que es leche desnatada en polvo; para la detección de huevo, el NIST RM 8445 que es huevo en polvo (Kerbach *et al.*, 2009; Abbott *et al.*, 2010; y Poms *et al.*, 2010); y para el gluten, la PWG es un material bien caracterizado que se ha propuesto, y aceptado generalmente (Van Eckert *et al.*, 2006). Tiene algunas limitaciones ya que es específico para gliadina, pero se ha usado también para cuantificar prolaminas en cereales que contienen gluten (Díaz-Amigo y Popping, 2013).

Como se ha dicho anteriormente, la matriz alimentaria analizada puede tener un gran impacto en el rendimiento del método ELISA, pudiéndose dar interferencias entre el analito alérgeno y sustancias de la matriz alimentaria (compuestos fenólicos y taninos por ejemplo). Por tanto, cuando se desarrolla un método se deben identificar de una manera clara para qué matrices es aplicable, para cuáles presenta dificultad de aplicabilidad y qué estados del alérgeno alimentario (crudo, cocinado, o ambos) es capaz de detectar el método. La guía para la validación de métodos de ELISA cuantitativos para alérgenos alimentarios, recoge una lista de matrices recomendadas para la validación del método de detección de huevo y leche (Abbott *et al.*, 2010).

Como complemento a la guía de Abbott *et al.* (2010), es interesante mencionar las consideraciones de Lacorn *et al.* (2018) que, desde su experiencia práctica, recomendaron una serie aspectos a tener en cuenta en el uso de kits comerciales de ELISA para la medida de alérgenos y gluten, recogidos en la Tabla 26.

**Tabla 26.** Fiabilidad de los resultados analíticos de alérgenos alimentarios y gluten.

#### **Estudio del manual del kit e informe de validación**

- Comprobar para que matrices es el uso previsto
- Comprobar la estrategia de extracción
- Identificar las limitaciones del kit ELISA
- Comprobar las reactividades cruzadas

#### **Comprobar cada ensayo analítico**

- Resultado negativo de la muestra control negativo
- Los resultados están dentro del rango de la muestra de control positivo
- Consultar los criterios de cumplimiento de la curva de calibrado
- Coeficiente de variación <10% entre replicados

#### **Verificar la homogeneidad de las muestras problema**

- Analizar cinco alícuotas independientes de la muestra
- Comprobar si es probable el contacto cruzado en el laboratorio

#### **Evaluar la composición de la muestra**

- Verificar que los ingredientes del alimento no dan falsos positivos o negativos
- Analizar los ingredientes por separado si la muestra compuesta analizada resulta positiva o negativa inesperadamente
- Puede ser necesario fortificar matrices o ingredientes negativos

#### **Matrices complejas de alimentos podrían reaccionar con el analito**

- Simular el procesado de cocinado con muestras adicionadas
- Verificar la recuperación de muestras adicionadas
- Validar el límite de detección y de cuantificación para muestras problema

#### **Asegurar las condiciones higiénicas**

- Tomar muestras de superficies de líneas de producción compartidas
- Analizar el agua de limpieza

#### **Usar otros métodos de confirmación**

- ELISA
- LFD
- PCR
- LC-MS/MS

#### **Considerar cualquier otro riesgo**

- El material de referencia y el analito extraído de la matriz deberían ser comparables
- Si el analito es fragmentado, usar un ELISA competitivo

En 2020, se ha publicado la Norma UNE-EN ISO 15842:2020 “Productos alimenticios. Detección de alérgenos alimentarios. Consideraciones generales y validación de los métodos.” Este documento, proporciona definiciones, directrices y requisitos de validación, incluyendo el uso de MR, para métodos de análisis basados en ácidos nucleicos, cromatográficos e inmunoensayos. Enfatiza el reto de obtener resultados comparables en el análisis de alérgenos y pone de manifiesto el número limitado de MR, incluyendo en el término a los MRC y materiales de control de calidad. A continuación, se recogen varios de los términos y definiciones de interés relacionados con nuestro estudio (AENOR, 2020):

- Precisión: proximidad del acuerdo entre los resultados de ensayo obtenidos bajo condiciones estipuladas (repetibilidad y reproducibilidad).
  - o Condiciones de repetibilidad: el mismo procedimiento de medición o de ensayo, el mismo operador, el mismo equipamiento de medición o ensayo usado en las mismas condiciones e instalaciones y en pequeños intervalos de tiempo.
  - o Condiciones de reproducibilidad: el mismo procedimiento de medición o de ensayo, distintos operadores, equipo diferente e instalaciones y en diferentes momentos.

La precisión depende solo de la distribución de los errores aleatorios y no está relacionada con el valor verdadero o con el valor especificado. La medida de la precisión, generalmente, se expresa en términos de imprecisión y se calcula como una desviación típica de los resultados de ensayo (una precisión baja se refleja con una mayor desviación típica), varianzas o coeficientes de variabilidad.

- Veracidad: proximidad del acuerdo entre la esperanza matemática de un resultado de ensayo o un resultado de la medición y un valor verdadero (en la práctica se sustituye por el valor de referencia aceptado). La medida de veracidad generalmente se expresa en términos de sesgo. La veracidad a veces se designa como “exactitud de la media”.
- Exactitud: proximidad del acuerdo entre un resultado de ensayo o resultado de la medición y el valor verdadero (en la práctica se sustituye por el valor de referencia aceptado). Implica una combinación de componentes aleatorios y un error sistemático común o componente de sesgo, por lo que hace referencia a una combinación de veracidad y precisión.
- Recuperación: proporción de la cantidad de un analito presente o añadido a la porción analítica del material de ensayo que se extrae y se determina para su posterior medición.

A finales de 2017, la AECOSAN convocó una reunión del Grupo de Trabajo de Laboratorios de Alérgenos formado por representantes del laboratorio de referencia del Centro Nacional de Alimentación (CNA) y de laboratorios de control

oficial de las CC. AA., incluido el Laboratorio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública del CEMILVETDEF. El objetivo de la reunión era identificar los problemas analíticos en la detección de alérgenos en alimentos con el fin de mejorar y armonizar la comparabilidad de los resultados en los análisis de alérgenos. Entre los acuerdos alcanzados, se estableció el ensayo ELISA como técnica de referencia y se determinaron criterios de aceptación exigibles al método analítico referidos a la curva de calibración, exactitud y precisión. En la última reunión del Grupo de Trabajo, celebrada en febrero de 2020, se revisaron los acuerdos adoptados en la primera reunión y se reafirmó la utilidad de dichos criterios de aceptación.

## **CAPÍTULO III**

---

# **EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS PLATOS QUE INTEGRAN LOS MENÚS INFANTILES**



## CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS PLATOS QUE INTEGRAN LOS MENÚS INFANTILES

El **objetivo** específico de este capítulo es evaluar la calidad microbiológica de los platos servidos, teniendo en cuenta criterios microbiológicos de seguridad alimentaria e higiene de los procesos establecidos por la normativa legal y la literatura científica.

Para el desarrollo de este objetivo se han investigado y realizado recuentos de microorganismos patógenos (*Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter* spp.) e indicadores de higiene del proceso: aerobios mesófilos totales (AMT), enterobacterias (EB), coliformes totales (CT), *Escherichia coli* (EC) y estafilococos coagulasa positivos (ECP), según el tipo de alimento, tratamiento térmico recibido, modalidad de gestión y estación del año.

### 3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.1 Diseño

Se realizó un estudio observacional transversal sobre los platos servidos en los comedores de los CEI del Ministerio de Defensa, durante el año 2017 (de enero a julio del curso 2016-2017, y de septiembre a diciembre del curso 2017-2018).

#### 3.1.2 Población a estudio

El estudio se ha centrado en los platos de los menús servidos en los CEI del Ministerio de Defensa:

- **Menú de iniciación** a base de purés: puré de legumbres o puré de verduras con ternera, pollo y pescado blanco. Este menú estaba destinado a niños de entre 6 meses y 1 año de edad.
- **Menú completo** formado por un primer plato, un segundo plato y un postre: el primer plato estaba constituido principalmente por legumbres, verduras, cremas de hortalizas o sopas; el segundo plato tenía como base carne o pescado con guarnición de patatas o ensalada; y el postre consistía en fruta (pera, manzana, naranja o plátano) o un lácteo. Este menú estaba destinado a niños de entre 1 año y 3 años de edad.

Las muestras se tomaron en 17 CEI, 12 con cocina propia para la elaboración de comidas (GD) y 5 con servicio de *catering* (GC).

#### 3.1.3 Muestreo

Durante el año 2017, se realizó una campaña de control oficial de los menús servidos en los comedores de los CEI del Ministerio de Defensa, realizándose

el muestreo según criterio de la autoridad sanitaria competente (IGESANDEF). Así, el veterinario inspector asignado a cada CEI, cumpliendo el cronograma de la campaña de control oficial, realizó un muestreo no probabilístico consecutivo durante 5 días tanto del menú de iniciación como del menú completo.

En consecuencia, en el diseño de este estudio, no se pudo calcular estadísticamente el tamaño muestral necesario. Al final de la campaña, el número total de muestras recibidas y analizadas fue de 318. En la Tabla 27 se recogen las características de las muestras analizadas que se recibieron durante la campaña de control oficial.

**Tabla 27.** Número de muestras (n) analizadas según el tipo de plato, tratamiento térmico, modelo de gestión y estación del año.

	Invierno (n=74)				Primavera (n=73)				Verano (n=114)				Otoño (n=57)				Total
	A		B		A		B		A		B		A		B		
	GD	GC	GD	GC	GD	GC	GD	GC	GD	GC	GD	GC	GD	GC	GD	GC	
1.º	15	5	-	-	7	10	3	-	17	10	3	-	14	-	1	-	85
2.º	14	5	-	-	8	5	2	5	16	8	3	2	10	-	3	-	81
3.º	-	-	15	-	-	-	5	8	-	-	20	6	-	-	15	-	69
4.º	15	5	-	-	10	10	-	-	19	10	-	-	14	-	-	-	83
<b>Total</b>	44	15	15	-	25	25	10	13	52	28	26	8	38	-	19	-	<b>318</b>

1.º: Primer plato. 2.º: Segundo plato. 3.º: Postre. 4.º: Puré menú iniciación. A: Comidas preparadas con tratamiento térmico. B: Comidas preparadas sin tratamiento térmico o con tratamiento térmico, pero con algún ingrediente no sometido a tratamiento térmico. GD: Gestión directa. GC: Gestión contratada.

-: No se analizaron muestras con esas variables.

Las muestras se tomaron de tal manera que se evitó la contaminación cruzada y se introdujeron en un recipiente estéril, que se precintó, etiquetó y envió, a temperatura de refrigeración o congelación (se descongelaron en refrigeración), para su análisis al Laboratorio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública del CEMILVETDEF.

### 3.1.4 Criterios de inclusión

Se aceptaron las muestras de los menús iniciales y completos que se recibieron perfectamente empaquetadas e identificadas.

### 3.1.5 Criterios de exclusión

Se rechazaron las muestras de los menús iniciales y completos perfectamente empaquetadas e identificadas, pero que en el momento de la recepción hubieran perdido la cadena de frío.

### 3.1.5 Variables de estudio

Las variables de estudio fueron las que se describen a continuación:

### 3.1.5.1 Variables cualitativas

- Tipo de plato: primer plato, segundo plato, fruta y puré.
- Tratamiento térmico: grupo A (comidas preparadas con tratamiento térmico) y grupo B (comidas preparadas sin tratamiento térmico o con tratamiento térmico, pero con algún ingrediente no sometido a tratamiento térmico).
- Modelo de gestión: GD (gestión directa con elaboración de comida en cocina propia) y GC (gestión contratada donde la comida procede de un servicio de *catering*).
- Estación del año: invierno, primavera, verano, otoño.
- Muestras positivas/negativas:
  - o Detectado/No detectado en la investigación de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Cronobacter* spp.
  - o Recuentos que superaron/No superaron el límite inferior de cuantificación del sistema TEMPO de  $1,0 \times 10^2$  UFC/g para AMT, y el límite inferior de cuantificación del sistema TEMPO de  $1,0 \times 10^1$  UFC/g para el resto de microorganismos indicadores de higiene del proceso (EB, CT, EC y ECP).
- Muestras aceptables/no aceptables:
  - o Cumplieron/No cumplieron el límite establecido por el criterio de seguridad del Reglamento (CE) n.º 2375/2005 para *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Cronobacter* spp.
  - o Muestras de los microorganismos indicadores de higiene del proceso negativas y las positivas que obtuvieron un recuento igual o inferior al límite microbiológico de referencia (Tabla 1)/Muestras con recuentos superiores al límite microbiológico de referencia (Tabla 1).

### 3.1.5.2 Variables cuantitativas

- Recuento (log UFC/g) de *L. monocytogenes* y de microorganismos indicadores de higiene del proceso: AMT, EB, CT, EC y ECP.

## 3.1.6 Materiales utilizados para el análisis microbiológico

### 3.1.6.1 Preparación de la muestra

#### 3.1.6.1.1 Reactivos

- Agua de peptona tamponada (bioMérieux®): medio listo para su empleo, cuya composición se detalla en la Tabla 28.

**Tabla 28.** Composición del agua de peptona tamponada.

Composición	Cantidad
Digesto enzimático de tejidos animales	10 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato de hidrógeno sódico dodecahidratado (NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> X12H <sub>2</sub> O)	9 g
Fosfato de hidrógeno dipotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,5 g
Agua	1000 ml

### 3.1.6.1.2 Material

- Diluidor gravimétrico IUL Instruments®, con una resolución de 0,1 g y una tolerancia de  $\pm 0,2$  g.
- Pipetas de capacidades nominales de 10 y 1 ml graduadas en divisiones de 0,5 y 0,1 ml y con una tolerancia de  $\pm 0,2\%$ .
- Homogeneizador Stomacher® 400 Circulator.
- Bolsas para Stomacher® estériles con filtro.
- Pinzas y tijeras estériles.

### 3.1.6.2 Recuento de microorganismos indicadores de higiene del proceso

#### 3.1.6.2.1 Reactivos

- Agua ultrapura estéril como diluyente secundario.
- Medios de cultivo TEMPO® AC, TEMPO® EB, TEMPO® TC, TEMPO® EC y TEMPO® STA: cada frasco contiene una dosis individual de medio de cultivo deshidratado para reconstituir con 4 ml de agua ultrapura estéril. En la Tabla 29 se indica la composición en g/l de solución reconstituida de cada medio de cultivo.

**Tabla 29.** Composición, en g/l, de solución reconstituida de los medios de cultivo TEMPO®.

Medio de cultivo	Composición	g/l
TEMPO® AC	Sustancia nutritiva y suplementos de crecimiento	4,5
	Sistema de tampón	25,7
	Sustratos	0,006
	Agente antiespumante	0,4
TEMPO® EB	Peptonas vegetales	10
	Azúcares	26
	Suplementos de crecimiento	0,5
	Cloruro sódico	5
	Sistema de tampón	16
	Desoxicolato sódico (bovino y ovino)	0,75
	Indicador fluorescente	0,05
	Agente antiespumante	0,4
	Lactosa (bovina)	10
	Nutrientes (bovinos y porcinos)	19
TEMPO® TC	Suplementos de crecimiento	0,25
	Sistema de tampón	5,16
	Desoxicolato sódico (bovino y ovino)	0,75
	Indicador fluorescente pH	0,06
	Agente antiespumante	0,4
TEMPO® EC	Bio-Soja y sustancias nutritivas	9
	Sal sódica MOPS (3-(N-morfolino) propanosulfónico)	20,8
	Suplementos de crecimiento	0,25
	Ácido MOPS	12,6
	Desoxicolato sódico (bovino y ovino)	0,7
	Sustrato y reguladores enzimáticos	0,19
	Agente antiespumante	0,4
	Peptonas animales (bovina y porcina) y de verduras	12,5
TEMPO® STA	Azúcares y suplementos de crecimiento	11
	Sistema de tampón	10
	Agentes selectivos	10,25
	Indicador fluorescente pH	0,06
	Agente antiespumante	0,4

### 3.1.6.2.2 Material

- Agitador excéntrico de tubos.
- Pipetas de capacidades nominales de 10 ml y de 1 ml, graduadas en divisiones de 0,5 ml y de 0,1 ml respectivamente y con una tolerancia de  $\pm 2\%$ .
- Dispensador automático con una tolerancia de  $\pm 2\%$ .

- Estufas de cultivo MEMMERT® con los siguientes rangos de trabajo:  $31 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Tarjetas TEMPO® AC, TEMPO® EB, TEMPO® TC, TEMPO® EC y TEMPO® STA, listas para su empleo, con su tubo de transferencia.
- Unidad de llenado TEMPO® de bioMérieux® (Figura 14).
- Unidad de lectura TEMPO® de bioMérieux® (Figura 15).
- Software TEMPO® de bioMérieux®.



Figura 14. Unidad de llenado TEMPO® de bioMérieux®



Figura 15. Unidad de lectura TEMPO® de bioMérieux®

### 3.1.6.3 Investigación de *Salmonella* spp. mediante método automatizado

#### 3.1.6.3.1 Reactivos

- Kit VIDAS® *Salmonella* SLM compuesto por: cartuchos SLM, conos SPR® SLM, estándar SLM, control positivo SLM y control negativo SLM.
- Caldo *Salmonella* Xpress 2 (SX2®) de bioMérieux®. Medio listo para su empleo, cuya composición se detalla en la Tabla 30.

Tabla 30. Composición, en g/l, del caldo de cultivo selectivo SX2®.

Composición	g/l
Peptona de caseína y de carne (bovina o porcina)	15
Sistema de tampón	20
Mezcla de sales	20
Extracto de levadura	5
Glucosa	0,5
Agentes selectivos	0,25

#### 3.1.6.3.2 Material

- Pipetas de capacidad nominal de 1 ml, graduadas en divisiones de 0,1 ml y con una tolerancia de  $\pm 2\%$ .
- Equipo mini-VIDAS® (Figura 16).
- Bloque calefactor VIDAS® Heat & Go.
- Estufas de cultivo MEMMERT® con los siguientes rangos de trabajo:  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Agitador de tubos tipo vórtex.
- Asas de siembra de platino y de picadura.



Figura 16. Equipo miniVIDAS® de bioMérieux®

### 3.1.6.4 Confirmación de positivos a *Salmonella* spp. mediante método horizontal

#### 3.1.6.4.1 Reactivos

- Agua ultrapura estéril.
- Medio de cultivo Hektoen de OXOID®. Medio deshidratado cuya composición final tras ser reconstituido se recoge en la Tabla 31.

**Tabla 31.** Composición, en g/l, del medio de cultivo selectivo Hektoen.

Composición	g/l
Peptona	12
Extracto de levadura	3
Lactosa	12
Sacarosa	12
Salicilina	2
Sales biliares	9
Cloruro de sodio	5
Tiosulfato sódico	5
Citrato férrico-amónico	1,5
Fuchina ácida	0,1
Azul de bromotimol	0,065
Agar	14

- Medio de cultivo Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) OXOID®. Medio deshidratado cuya composición final tras ser reconstituido se recoge en la Tabla 32.

**Tabla 32.** Composición, en g/l, del medio de cultivo selectivo XLD.

Composición	g/l
Amonio hierro (III) citrato	0,8
Extracto de levadura	3
Lactosa	7,5
L-lisina	5
Rojo fenol	0,08
Sacarosa	7,5
Cloruro de sodio	5
Desoxicolato de sodio	1
Tiosulfato de sodio	6,8
D (+)-Xilosa	3,5
Agar	13,5

Se siguieron las instrucciones del fabricante para su reconstitución, midiendo y ajustando, si fuese necesario, el pH a  $7,4 \pm 0,2$ . Se dispensaron 15 ml de medio por placa de Petri.

- Agar nutritivo OXOID®. Medio deshidratado cuya composición final tras ser reconstituido se recoge en la Tabla 33.

**Tabla 33.** Composición, en g/l, del medio de cultivo agar nutritivo.

Composición	g/l
Peptona	5
Lab lemco poder	1
Cloruro de sodio	5
Extracto de levadura	2
Agar	15

Se siguieron las instrucciones del fabricante para su reconstitución, midiendo y ajustando el pH a  $6,8 \pm 0,1$ , cuando fue necesario. Se dispensaron en condiciones estériles 10 ml de medio por tubo.

Se dejó reposar el tubo inclinado  $30^\circ$  con la horizontal hasta que se solidificó el medio.

- Agar urea OXOID®. Medio deshidratado cuya composición final tras ser reconstituido se recoge en la Tabla 34.

**Tabla 34.** Composición, en g/l, del medio de cultivo agar urea.

Composición	g/l
Peptona	1
Glucosa	1
Cloruro de sodio	5
Dihidrógeno-ortofosfato de potasio	0,8
Fosfato disódico	1,2
Rojo fenol	0,012
Agar	15

Se dejó reposar el tubo inclinado  $30^\circ$  con la horizontal hasta que se solidificó el medio.

- Agar *Triple Sugar Iron* (TSI) OXOID®. Medio deshidratado cuya composición final tras ser reconstituido se recoge en la Tabla 35.

**Tabla 35.** Composición, en g/l, del medio de cultivo agar TSI.

Composición	g/l
Extracto de carne	3
Extracto de levadura	3
Peptona	20
Lactosa	10
Cloruro sódico	5
Dextrosa	1
Sacarosa	10
Citrato férrico	0,3
Hiposulfito sódico	0,3
Rojo fenol	0,05
Agar-agar	12

Se dejó reposar el tubo inclinado 30° con la horizontal hasta que se solidificó el medio.

- Tiras Api®-20E de bioMérieux®.

#### 3.1.6.4.2 Material

- Campana de flujo laminar NUAIRE®, de seguridad biológica nivel II.
- Asas de siembra de platino y de picadura.
- Estufas de cultivo MEMMERT® ajustadas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $41,5^\circ\text{C}$ .

#### 3.1.6.5 Recuento en placa de *Listeria monocytogenes*

##### 3.1.6.5.1 Reactivos

- Agua de peptona tamponada (bioMérieux®): medio listo para su empleo, cuya composición se ha detallado en la Tabla 28.
- Medio de cultivo ALOA de bioMérieux®. Es un medio suministrado en placas de Petri listo para su empleo, cuya composición se recoge en la Tabla 36.

**Tabla 36.** Composición, en g/l, del medio de cultivo listo para su uso ALOA.

Composición	g/l
Digesto enzimático de tejido animal	18
Digesto enzimático de caseína	6
Extracto de levadura	10
Piruvato sódico	2
Glucosa	2
Glicerofosfato de magnesio	1
Sulfato de magnesio	0,5
Cloruro sódico	5
Cloruro de litio	10
Fosfato disódico de hidrógeno anhidro	2,5
X-glucósido	0,05
Ácido nalidíxico	0,02
Ceftazidima	0,02
Polimixina B	76700 U
Anfotericina B	0,01
Fosfatidilinositol	2
Agar	13,5

### 3.1.6.5.2 Material

- Asas de siembra de platino y de picadura.
- Pipetas de capacidad nominal de 1 ml, graduadas en divisiones de 0,1 ml y con una tolerancia de  $\pm 2\%$ .
- Estufa de cultivo MEMMERT® ajustada a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Agitador excéntrico de tubos tipos vórtex.
- Equipo miniVIDAS® de bioMérieux®.

### 3.1.6.6 Investigación de *Cronobacter spp.* mediante método horizontal

#### 3.1.6.6.1 Reactivos

- Agua ultrapura estéril.
- Agua de peptona tamponada (bioMérieux®): medio listo para su empleo, cuya composición se ha detallado en la Tabla 28.
- Caldo *Cronobacter Selective Broth* (CSB) de OXOID®. Medio deshidratado cuya composición final tras ser reconstituido se recoge en la Tabla 37.

**Tabla 37.** Composición, en g/l, del caldo de cultivo selectivo CSB.

Composición	g/l
Digesto enzimático de tejidos animales	10
Extracto de carne	3
Cloruro de sodio	5
Púrpura de bromocresol	0,04
Sacarosa	10

- Medio de cultivo *Agar Chromogenic Cronobacter Isolation* (CCI) de OXOID®. Medio deshidratado cuya composición final tras ser reconstituido se recoge en la Tabla 38.

**Tabla 38.** Composición, en g/l, del medio de cultivo cromogénico CCI.

Composición	g/l
Digerido trípico de caseína	7
Extracto de levadura	3
Cloruro sódico	5
5-bromo-4-cloro-3-indol- $\alpha$ -D-glucopiranosida	0,15
Desoxicolato sódico	0,25
Citrato de amonio férrico	1
Tiosulfato sódico	1
Agar	9

### 3.1.6.6.2 Material

- Campana de flujo laminar NUAIRE®, de seguridad biológica nivel II.
- Pipetas de capacidad nominal de 1 ml, graduadas en divisiones de 0,1 ml y con una tolerancia de  $\pm 2\%$ .
- Asas de siembra de platino y de picadura.
- Agitador de tubos tipo vórtex.
- Estufas de cultivo MEMMERT® ajustadas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 3.1.6.7 Confirmación de *Cronobacter* spp. mediante PCR en tiempo real

#### 3.1.6.7.1 Reactivos

- Agua libre de ARN-asa.
- SureTect™ *Cronobacter* species PCR Assay (Thermo Scientific™).
- Tampón de lisis.
- Proteinasa K.
- Sure Tect *Cronobacter* PCR tubes.
- Control positivo externo (cepa *C. sakazakii* NCTC 11467 de Sigma-Aldrich®).

#### 3.1.6.7.2 Material

- Campana de flujo laminar NUAIRE® de seguridad biológica nivel II.
- Agitador excéntrico de tubos tipo vórtex.
- Termobloque con capacidad de alcanzar  $97 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- Termobloque con capacidad de alcanzar  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- Pipetas automáticas con capacidades de 1-10  $\mu\text{l}$ , 10-100  $\mu\text{l}$  y 100-1000  $\mu\text{l}$ .
- Sistema PCR: Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System.

### 3.1.7 Metodologías de análisis

El Laboratorio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública del CEMILVETDEF está certificado por la Norma ISO 17025:2017 y todas las técnicas empleadas en este trabajo, a excepción de la investigación de *Cronobacter* spp., están acreditadas por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), lo que asegura la fiabilidad de los resultados.

En la Tabla 39 se recogen los métodos analíticos utilizados para cada microorganismo analizado. Tanto la investigación de *Salmonella* spp. y de *Cro-*

*nobacter* spp. como la detección y recuento en placa de *L. monocytogenes* se han basado en Normas ISO, pero con fases automatizadas (VIDAS®) y PCR en tiempo real, lo que reduce su laboriosidad y tiempo de obtención de resultados. Igualmente, para el recuento de los microorganismos indicadores de higiene del proceso se ha utilizado un método alternativo, automatizándolo mediante el equipo TEMPO® basado en la técnica del NMP.

**Tabla 39.** Métodos analíticos utilizados para cada parámetro.

Método analítico	Parámetro analizado
ISO 6579:2017 y VIDAS® SLM	Investigación de <i>Salmonella</i> spp.
ISO 11290:2017 y VIDAS® LMO2	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>
ISO 22964: 2017 y PCR tiempo real	Investigación de <i>Cronobacter</i> spp.
TEMPO® AC	Recuento de aerobios mesófilos totales
TEMPO® EB	Recuento de enterobacterias
TEMPO® TC	Recuento de coliformes totales
TEMPO® EC	Recuento de <i>E. coli</i>
TEMPO® STA	Recuento de estafilococos coagulasa positivos

### 3.1.7.1 Preparación de la muestra

- En el diluidor gravimétrico se pesaron 25 g representativos de la muestra en una bolsa de plástico estéril, con una precisión del  $\pm 5\%$ .
- Se añadió una cantidad de agua de peptona tamponada igual a 9 veces la masa de la muestra.
- Se homogeneizó durante un tiempo no inferior a 30 segundos ni superior a 2,5 minutos.

### 3.1.7.2 Método automatizado para investigación de *Salmonella* spp.

Se empleó el sistema automatizado VIDAS®, certificado por NF VALIDATION según la Norma ISO 16140.

Tras preparar la dilución inicial como se ha descrito en el apartado correspondiente, se procedió al preenriquecimiento de la muestra.

- Se incubó la muestra diluida durante  $22 \pm 4$  h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Tras la incubación, se transfirieron 0,1 ml de la suspensión a 10 ml de caldo SX2® para enriquecer la muestra.
- Se incubó durante  $24 \pm 2$  horas a  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Se homogeneizó en un agitador tipo vórtex el caldo SX2® durante 10 segundos y se transfirieron 0,5 ml del caldo SX2® al pocillo para la muestra del cartucho VIDAS®.

- Se utilizó un cartucho VIDAS® SLM con pocillos que contienen los reactivos y un cono SPR® SLM tapizado con anticuerpos por cada muestra, control o estándar a analizar.
- Se calentó el cartucho durante  $15 \pm 1$  minutos según las instrucciones del VIDAS® Heat & Go, y se dejó enfriar durante 10 minutos.
- Se seleccionó el test SLM en el equipo VIDAS®, se identificaron las muestras, se introdujeron los cartuchos a analizar y los correspondientes conos y se inició el ensayo.

Aunque ninguna muestra resultó positiva, la confirmación se habría realizado mediante microbiología convencional (método horizontal para la determinación de *Salmonella* spp.) tal y como se describe en el siguiente apartado.

### **3.1.7.3 Método horizontal de confirmación de positivos a *Salmonella* spp.**

Es el método de referencia descrito en la Norma UNE-EN ISO 6579-1:2017: Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.:

- Por cada tubo positivo de caldo SX2®, sembrar por agotamiento con un asa de platino la superficie de dos placas de agar XLD y de agar Hektoen.
- Incubar las placas durante  $24 \pm 3$  h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Examinar las placas después de una incubación de  $24 \pm 3$  h, con el fin de buscar la presencia de colonias típicas de *Salmonella* spp., que respondan a las siguientes características:
  - o En Agar XLD: tienen un centro negro y una zona ligeramente transparente de color rojizo debido al cambio de color del indicador.
  - o En Agar Hektoen: aparecen de color azul o azul-verdoso con o sin centros negros. Algunas salmonelas pueden dar amplios centros negros e incluso aparecer como colonias completamente negras.
- Para realizar la confirmación bioquímica, sembrar e inocular con el asa de picadura, al menos 5 colonias sospechosas. Si existen menos de 5 se toman las colonias que haya. Sin flamear entre cada medio, se siembran en este orden:
  - o Agar urea: en la superficie.
  - o Agar TSI: en profundidad y en superficie.
  - o Agar nutritivo: en estría apretada.
- Incubar los tubos a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 3$  horas.
- Se toman del agar nutritivo, con una asa bien cargada, solo colonias que hayan dado el resultado correcto en las pruebas bioquímicas (ureasa

negativas en el agar urea, y formación de gas, producción de SH<sub>2</sub> y fermentación de la glucosa y no de lactosa en el agar TSI) y se inoculan en un tubo que contiene 5 ml de agua destilada estéril.

- Homogeneizar y comprobar que aparece turbidez patente en el agua e inocular en la tira API® 20E con una pipeta estéril.
- Preparar e interpretar la tira API® 20E según las instrucciones del fabricante.

#### **3.1.7.4 Método horizontal de recuento en placa de *Listeria monocytogenes***

Se realizó el procedimiento conforme a la Norma UNE-EN ISO 11290-2:2017: Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *L. monocytogenes*.

La dilución inicial, tal como se ha descrito en el apartado correspondiente, se deja reposar durante 1 h ± 5 minutos a 20 ± 2°C en la estufa.

- Se sembró 1 ml repartido en 3 placas de ALOA por extensión en la superficie.
- Se dejaron las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la absorción del inóculo.
- Se incubaron a 37 ± 1°C. El recuento final se obtuvo a las 48 h ± 2 h. No obstante, se realizó una lectura preliminar a las 24 h ± 2 h para detectar más rápidamente las posibles muestras muy contaminadas.

Aunque no hubo muestras positivas, para la confirmación se habría utilizado el sistema automatizado VIDAS®, certificado por NF VALIDATION según la Norma 16140, tal y como se describe a continuación:

- Para confirmar que las colonias típicas azul-verdosas con halo opalescente pertenecen a *L. monocytogenes* y no a *L. ivanovii*, preparar una suspensión en 2 ml de solución salina de peptona con una colonia típica (aislada o no).
- Transferir 0,5 ml de esta suspensión en el pocillo para la muestra del cartucho VIDAS LMO2 y realizar el test VIDAS®. Un resultado positivo confirma la presencia de *L. monocytogenes*.

#### **3.1.7.5 Investigación de *Cronobacter* spp.**

El estudio de la calidad microbiológica de los menús servidos en los CEI del Ministerio de Defensa supuso realizar, por primera vez en el Servicio de Seguridad Alimentaria, la investigación de *Cronobacter* spp. Para el desarrollo del método analítico se eligió como referencia la metodología descrita en la Norma UNE-EN ISO 22964:2017: Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección de *Cronobacter* spp. Las fases de preenriquecimiento, enriquecimiento y aislamiento se ajustaron a lo recogido en la norma

estandarizada. Para la fase de confirmación de la colonia típica aislada, la norma permite el uso de otros procedimientos alternativos contemplados en la Norma UNE-EN ISO 7218:2008/A1:2013. Entre ellos se encuentran las galerías miniaturizadas para la identificación bioquímica y las técnicas ADN. Esta última alternativa fue la elegida, a través de la técnica de PCR en tiempo real, en la que se usó el *Thermo Scientific™ SureTect™ Cronobacter* spp. PCR Assay, certificado por *NF VALIDATION* siguiendo el protocolo de validación de la Norma ISO 16140.

Tras preparar la dilución inicial como se ha descrito en el apartado correspondiente, se procedió al preenriquecimiento no selectivo de la muestra.

- Se incubó la bolsa entre 34°C y 38°C durante 18 h ± 2 h.
- Tras la incubación, se transfirieron 0,1 ml de la suspensión a 10 ml de caldo CSB para enriquecer la muestra.
- Se incubaron durante 24 h ± 2 h a 41,5 ± 1°C.
- Se homogeneizó en un agitador tipo vórtex el caldo CSB durante 10 segundos y se sembró con un asa de platino, por agotamiento, la superficie de una placa de agar CCI.
- Las placas se incubaron durante 24 h ± 2 h a 41,5 ± 2°C.
- Después de la incubación, se examinaron las placas cromogénicas, con el fin de buscar la presencia de colonias típicas presuntivas de *Cronobacter* spp., que respondían a las siguientes características: tamaño pequeño a medio (entre 1 mm a 3 mm) y de color azul a azul verdoso.
- Para realizar la confirmación mediante PCR en tiempo real, se inocularon con el asa de picadura al menos 5 colonias típicas o sospechosas en una suspensión de 1 ml de agua de peptona tamponada. Si existían menos de 5 se tomaban las colonias que hubiera.
- A cada tubo del tampón de lisis se añadieron 10 µl de proteinasa K y 10 µl de la alícuota de la colonia aislada, asegurándose que se alcanzaba la base del tubo, y se procedió a su mezcla.
- Se cerraron los tubos de lisis y se incubaron en el termobloque a 37 ± 2°C durante 10 minutos. Inmediatamente se transfirieron los tubos al termobloque de 95 ± 2°C y se incubaron durante 5 minutos.
- Se atemperaron las muestras a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Se aspiraron 20 µl de la mitad superior del tubo de lisis sin arrastrar las partículas del inferior y se transfirieron a los tubos del SureTect™ *Cronobacter* spp. PCR para rehidratar el *pellet*.
- Se sellaron los tubos con las tiras ópticas transparentes incluidas en el kit SureTect™ *Cronobacter* spp. PCR.

- Se colocaron los tubos en el termociclador Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System y se comenzó el ensayo.
- Las condiciones de PCR fueron las siguientes:
  - o Desnaturalización inicial de 2 minutos a  $95 \pm 2^\circ\text{C}$ .
  - o 40 ciclos de 3 segundos de desnaturalización a  $95 \pm 2^\circ\text{C}$  y 30 segundos de hibridación y extensión a  $60 \pm 2^\circ\text{C}$ .

El criterio para determinar si una muestra era positiva o negativa fue el siguiente:

- Positiva: la amplificación de la sonda de *Cronobacter* spp. superó el umbral antes del fin del ciclo 40.
- Negativa: no se produjo amplificación de la sonda de *Cronobacter* spp. y la amplificación de la sonda del *Internal Positive Control* (IPC) superó el umbral antes del ciclo 40.

#### **3.1.7.6 Recuento de microorganismos indicadores de higiene del proceso**

Se utilizó el sistema automatizado TEMPO®, certificado por NF VALIDATION conforme a los estándares de la Norma ISO 16140. El límite superior de recuento del equipo es de  $4,9 \times 10^5$  UFC/g para AMT y de  $4,9 \times 10^4$  UFC/g para el resto de microorganismos.

- Se inició la sesión en la estación de preparación del sistema TEMPO® y se identificó la muestra.
- Se preparó una dilución de la muestra de 1/400 en el caso de AMT y de 1/40 en el resto de microorganismos. Para ello, se regularon los dosificadores que contienen el diluyente secundario, uno a 3,9 ml para AMT y el otro a 3,0 ml para el resto de microorganismos. Se cebó la bomba eliminando los dos primeros volúmenes a distribuir.
- Se reconstituyó el medio de cultivo mediante el dosificador distribuyendo 3,9 ml en el caso de TEMPO® AC y 3,0 ml en el resto de medios de cultivo.
- Se aspiró de la bolsa con una pipeta estéril 0,1 ml en el caso de TEMPO® AC y 1 ml para el resto de microorganismos para transferirlo al frasco que contenía el medio de cultivo reconstituido correspondiente.
- Se seleccionó la tarjeta correspondiente para cada frasco de medio inoculado. Se asoció el identificador de la muestra a ensayar con los códigos de barras del medio inoculado y la tarjeta correspondiente mediante el lector de código de barras.
- Se colocó el frasco que contenía el medio inoculado en la gradilla de llenado. Se insertó la tarjeta en la ranura frente al frasco, introduciendo

el tubo de transferencia de la tarjeta dentro del frasco. La gradilla podía alojar 6 frascos con sus tarjetas y permitía el llenado simultáneo de las 6 tarjetas del sistema TEMPO®.

- Se insertó la gradilla en la unidad de llenado TEMPO® Filler y se comenzó el ciclo de llenado. Al finalizarlo, dicha unidad cortó y selló los tubos de transferencia.
- Se retiraron las tarjetas de la gradilla de llenado y se colocaron en las gradillas de incubación. Las tarjetas se insertaron en las ranuras, con sus etiquetas de cara al usuario (hacia el asa de la gradilla). Se agruparon en la misma gradilla las tarjetas a incubar a la misma temperatura.
- Se incubaron las tarjetas a la temperatura y durante el tiempo establecido en la Tabla 40 dependiendo del tipo de microorganismo.

**Tabla 40.** Temperaturas y tiempos de incubación de los microorganismos indicadores de higiene del proceso.

Microorganismos	Temperatura	Tiempo
Aerobios mesófilos totales	30 ± 1°C	40-48 h
Enterobacterias	35 ± 1°C	22-27 h
Coliformes totales	30 ± 1°C	24-27 h
<i>E. coli</i> β-glucoronidasa positivo	37 ± 1°C	24-27 h
Estafilococos coagulasa positivos	37 ± 1°C	24-27 h

### 3.1.8 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables cuantitativas mediante medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar), expresadas como  $\bar{x}$  (DE).

Para las variables categóricas se emplearon las frecuencias absolutas y relativas porcentuales.

Se determinó la normalidad de las distribuciones de las variables dependientes cuantitativas con la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

La asociación entre las variables independientes dicotómicas (modelo de gestión y tratamiento térmico) y la dependiente cuantitativa de distribución paramétrica, se determinó con el test t de Student. La homogeneidad de las varianzas se analizó con el test de Levene.

La asociación entre las variables independientes politómicas (tipo de plato y estaciones del año) y la dependiente cuantitativa se estimó con el test ANOVA. Las comparaciones múltiples *post hoc* se efectuaron mediante el test Bonferroni.

En todos los casos, como grado de significación estadística se empleó un valor de  $p < 0,05$  y la precisión con un intervalo de confianza del 95%.

La aplicación informática utilizada fue el programa estadístico IBM®SPSS® Statistics versión 24.

## 3.2 RESULTADOS

### 3.2.1 Microorganismos patógenos

En ninguna de las muestras analizadas se detectaron los patógenos *Salmonella* spp. ni *L. monocytogenes*. No obstante, *Cronobacter* spp. se aisló y confirmó en una muestra, en concreto, en la guarnición (ensalada de lechuga y maíz) de un segundo plato de merluza en salsa.

### 3.2.2 Microorganismos indicadores de higiene del proceso

La Tabla 41 recoge la prevalencia de muestras positivas y aceptables de los microorganismos indicadores AMT, EB, EC, CT y ECP y los recuentos medios, mínimos y máximos obtenidos en todas las muestras analizadas.

**Tabla 41.** Prevalencia de muestras positivas y aceptables y recuentos (log UFC/g) de los microorganismos indicadores (n=318).

	Muestras positivas n (%)	Recuento $\bar{x}$ (DE)	Mínimo- Máximo	Muestras aceptables n (%)
<b>AMT</b>	124 (38,99)	2,19 (0,84)	1,70-5,69	312 (98,11)
<b>EB</b>	49 (15,41)	0,96 (0,76)	0,70-4,69	308 (96,86)
<b>EC</b>	1 (0,31)	0,70 (0,03)	0,70-1,30	317 (99,69)
<b>CT</b>	31 (9,75)	0,86 (0,60)	0,70-4,69	310 (97,48)
<b>ECP</b>	14 (4,40)	0,72 (0,10)	0,70-1,32	318 (100,00)

DE: Desviación estándar. AMT: Aerobios mesófilos totales. EB: Enterobacterias. EC: *E. coli*. CT: Coliformes totales. ECP: Estafilococos coagulasa positivos.

Solo 13 muestras presentaron resultados no aceptables en, al menos, uno de los parámetros estudiados. En la Tabla 42, se presentan estas muestras desglosadas en función del tipo de plato, del tratamiento térmico, del modelo de gestión y de la estación del año.

**Tabla 42.** Relación de muestras no aceptables en función del tipo de plato, tratamiento térmico, modelo de gestión y estación del año.

	A		B	
	GD	GC	GD	GC
<b>Primer plato</b>	Arroz con tomate <sup>2</sup> Sopa de fideos <sup>3</sup>	-	2 ensaladas con pasta <sup>1,3</sup>	-
<b>Segundo plato</b>	Pastel de merluza <sup>2</sup> Cinta de lomo con tomate <sup>3</sup>	-	-	1 tortilla <sup>1</sup> , 1 lomo <sup>1</sup> y 3 merluzas (todos con ensalada) <sup>1,2,2</sup>
<b>Purés</b>	Puré de ternera <sup>2</sup> Puré de verduras <sup>3</sup>	-	-	-

A: Comidas preparadas con tratamiento térmico. B: Comidas preparadas sin tratamiento térmico o con tratamiento térmico, pero con algún ingrediente no sometido a tratamiento térmico. GD: Gestión directa. GC: Gestión contratada.

<sup>1</sup>primavera, <sup>2</sup>verano, <sup>3</sup>otoño.

En la Tabla 43 se reflejan las prevalencias de muestras positivas y los recuentos medios, mínimos y máximos obtenidos de AMT, EB, EC, CT y ECP según el tipo de plato, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el recuento de EB. Así, las frutas presentaron 0,38 log UFC/g de EB (IC 95%: 0,06-0,70) más que los primeros platos ( $p < 0,05$ ) y 0,45 log UFC/g de EB (IC 95%: 0,13-0,77) más que los purés ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 43.** Prevalencia de muestras positivas y recuentos (log UFC/g) de microorganismos indicadores de higiene del proceso según el tipo de plato.

	Microorganismos	Muestras positivas n (%)	Recuento $\bar{x}$ (DE)	Mínimo- Máximo
<b>Primer plato</b> (n= 85)	AMT	26 (30,59)	2,09 (0,80)	1,70-5,69
	EB	9 (10,59)	0,83 (0,55)	0,70-4,69
	EC	1 (1,18)	0,71 (0,06)	0,70-1,30
	CT	5 (5,88)	0,79 (0,52)	0,70-4,69
	ECP	4 (4,71)	0,72 (0,10)	0,70-1,32
<b>Segundo plato</b> (n = 81)	AMT	29 (35,80)	2,26 (1,00)	1,70-5,69
	EB	13 (16,05)	1,07 (1,02)	0,70-4,69
	EC	0 (0,00)	0,70 (0,00)	0,70-0,70
	CT	10 (12,35)	0,98 (0,87)	0,70-4,69
	ECP	2 (2,47)	0,71 (0,77)	0,70-1,32
<b>Fruta</b> (n = 69)	AMT	37 (53,62)	2,27 (0,80)	1,70-5,69
	EB	24 (34,78)	1,21 (0,89) <sup>1</sup>	0,70-4,69
	EC	0 (0,00)	0,70 (0,00)	0,70-0,70
	CT	14 (20,29)	0,92 (0,52)	0,70-2,98
	ECP	4 (5,80)	0,72 (0,10)	0,70-1,32
<b>Purés</b> (n = 83)	AMT	32 (38,55)	2,15 (0,72)	1,70-4,26
	EB	3 (3,61)	0,76 (0,36)	0,70-3,74
	EC	0 (0,00)	0,70 (0,00)	0,70-0,70
	CT	2 (2,41)	0,75 (0,35)	0,70-3,61
	ECP	4 (4,82)	0,72 (0,10)	0,70-1,32

DE: Desviación estándar. AMT: Aerobios mesófilos totales. EB: Enterobacterias. EC: *E. coli*. CT: Coliformes totales. ECP: Estafilococos coagulasa positivos.

<sup>1</sup>: Diferencias significativas (prueba ANOVA).

En la Tabla 44, se muestran los resultados correspondientes según el tratamiento térmico (grupo A y grupo B), encontrándose en los siguientes recuentos diferencias estadísticamente significativas: los platos no tratados térmicamente presentaron 0,49 log UFC/g de AMT (IC 95%: 0,25-0,73) más que los tratados térmicamente ( $p < 0,001$ ); 0,62 log UFC/g de EB más (IC 95%: 0,38-0,86) ( $p < 0,001$ ); y 0,32 log UFC/g de CT (IC 95%: 0,13-0,52) más ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 44.** Prevalencia de muestras positivas y recuentos (log UFC/g) de microorganismos indicadores de higiene del proceso según el tratamiento térmico.

	Microorganismos	Muestras positivas n (%)	Recuento $\bar{x}$ (DE)	Mínimo- Máximo
<b>A</b> (n = 227)	AMT	70 (30,84)	2,05 (0,67)	1,70-4,72
	EB	11 (4,85)	0,78 (0,46)	0,70-4,69
	EC	0 (0,00)	0,70 (0,00)	0,70-0,70
	CT	7 (3,08)	0,76 (0,40)	0,70-3,78
	ECP	9 (3,96)	0,72 (0,10)	0,70-1,32
<b>B</b> (n = 91)	AMT	54 (59,34)	2,54 (1,08) <sup>1</sup>	1,70-5,69
	EB	38 (41,76)	1,40 (1,11) <sup>1</sup>	0,70-4,69
	EC	1 (0,44)	0,71 (0,06)	0,70-1,30
	CT	24 (26,37)	1,09 (0,89) <sup>1</sup>	0,70-4,69
	ECP	5 (5,49)	0,72 (0,09)	0,70-1,32

DE: Desviación estándar. A: Comidas preparadas con tratamiento térmico. B: Comidas preparadas sin tratamiento térmico o con tratamiento térmico, pero con algún ingrediente no sometido a tratamiento térmico. AMT: Aerobios mesófilos totales. EB: Enterobacterias. EC: *E. coli*. CT: Coliformes totales. ECP: Estafilococos coagulasa positivos.

<sup>1</sup>: Diferencias significativas (prueba t de student).

En la Tabla 45 se comparan los modelos de gestión, observándose porcentajes de muestras positivas superiores de AMT, EB y CT en las cocinas de GD que en las de GC, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los recuentos.

**Tabla 45.** Prevalencia de muestras positivas y recuentos (log UFC/g) de microorganismos indicadores de higiene del proceso según el modelo de gestión.

	Microorganismos	Muestras positivas n (%)	Recuento $\bar{x}$ (DE)	Mínimo- Máximo
<b>Gestión directa</b> (n = 229)	AMT	96 (41,92)	2,24 (0,84)	1,70-5,69
	EB	41 (17,90)	0,98 (0,74)	0,70-4,69
	EC	1 (0,44)	0,70 (0,04)	0,70-1,30
	CT	26 (11,35)	0,86 (0,56)	0,70-4,69
	ECP	10 (4,37)	0,72 (0,87)	0,70-1,32
<b>Gestión contratada</b> (n = 89)	AMT	28 (31,46)	2,06 (0,82)	1,70-5,69
	EB	8 (8,99)	0,90 (0,80)	0,70-4,69
	EC	0 (0,00)	0,70 (0,00)	0,70-0,70
	CT	5 (5,62)	0,86 (0,70)	0,70-4,69
	ECP	4 (4,49)	0,72 (0,12)	0,70-1,32

DE: Desviación estándar. AMT: Aerobios mesófilos totales. EB: Enterobacterias. EC: *E. coli*. CT: Coliformes totales. ECP: Estafilococos coagulasa positivos.

Por último, en la Tabla 46 se muestran los resultados en función de la estación del año. Las menores prevalencias de muestras positivas para todos los parámetros analizados tuvieron lugar en invierno, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de esta estación para AMT, con 0,63 log UFC/g (IC 95%: 0,25-1,02) menos que en otoño ( $p < 0,001$ ) y 0,43 UFC/g (IC: 95%: 0,11-0,75) menos que en verano ( $p < 0,001$ ). También

se obtuvieron 0,41 log UFC/g de EB (IC 95%: 0,06-0,76) y 0,32 log UFC/g de CT (IC 95%: 0,04-0,60) menos que en otoño ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 46.** Prevalencia y recuentos (log UFC/g) de microorganismos indicadores de higiene del proceso según la estación del año.

	Microorganismos	Muestras positivas n (%)	Recuento $\bar{x}$ (DE)	Mínimo- Máximo
<b>Invierno</b> (n= 74)	AMT	16 (21,62)	1,85 (0,40)	1,70-4,32
	EB	4 (5,41)	0,74 (0,18)	0,70-1,65
	EC	0 (0,00)	0,70 (0,00)	0,70-0,70
	CT	1 (1,35)	0,71 (0,12)	0,70-1,77
	ECP	2 (2,70)	0,71 (0,08)	0,70-1,32
<b>Primavera</b> (n = 73)	AMT	26 (35,62)	2,16 (0,85)	1,70-5,57
	EB	11 (15,07)	0,94 (0,74)	0,70-4,69
	EC	0 (0,00)	0,70 (0,00)	0,70-0,70
	CT	6 (8,22)	0,85 (0,62)	0,70-4,69
	ECP	1 (1,37)	0,71 (0,07)	0,70-1,32
<b>Verano</b> (n = 114)	AMT	51(44,74)	2,28 (0,91) <sup>1</sup>	1,70-5,69
	EB	19 (16,67)	1,01 (0,86)	0,70-4,69
	EC	0 (0,00)	0,70 (0,00)	0,70-0,70
	CT	12 (10,53)	0,87 (0,62)	0,70-4,69
	ECP	7 (6,14)	0,73 (0,12)	0,70-1,32
<b>Otoño</b> (n = 57)	AMT	31 (54,39)	2,48 (0,95) <sup>1</sup>	1,70-5,69
	EB	15 (26,32)	1,15 (0,97) <sup>1</sup>	0,70-4,69
	EC	1 (1,75)	0,71 (0,08)	0,70-1,30
	CT	12 (21,05)	1,04 (0,83) <sup>1</sup>	0,70-4,69
	ECP	4 (7,02)	0,72 (0,07)	0,70-1,00

DE: Desviación estándar. AMT: Aerobios mesófilos totales. EB: Enterobacterias. EC: *E. coli*. CT: Coliformes totales. ECP: Estafilococos coagulasa positivos.

<sup>1</sup>: Diferencias significativas (prueba ANOVA).

### 3.3 DISCUSIÓN

El control microbiológico de los platos elaborados y servidos proporciona información, además de sobre la calidad del producto final, de la calidad de las materias primas, y de las posibles contaminaciones cruzadas o manipulaciones inadecuadas durante su preparación y/o servicio.

#### 3.3.1 Microorganismos patógenos

La no detección de *Salmonella* spp. ni de *L. monocytogenes* demuestran el cumplimiento de los límites establecidos por los criterios microbiológicos de seguridad alimentaria exigidos por la normativa europea (Reglamento (CE) n.º 2073/2005), revelando un adecuado nivel de seguridad microbiológica de las muestras analizadas.

En otros estudios realizados sobre la calidad microbiológica de las comidas servidas en comedores colectivos de alto riesgo (guarderías, colegios, universidades y hospitales) tampoco se detectaron estos patógenos (Pérez-Silva *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2011; Nagla *et al.*, 2014; Petruzzelli *et al.*, 2014; Petruzzelli *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2020a). Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en guarderías y colegios de Italia, se aisló *Salmonella* spp. en el 5% de las muestras de verduras frescas y *L. monocytogenes* en una ensalada de tomate. Los autores señalaron como posible causa la ineficacia del procedimiento de limpieza y desinfección de verduras (Marzano y Balzaretto, 2013). Otros autores han asociado la presencia de patógenos a un cocinado insuficiente (Jørgensen *et al.*, 2017).

En cuanto a *Cronobacter* spp., en nuestro estudio su presencia se confirmó en una muestra (0,31%), concretamente en la guarnición (lechuga y maíz) de un plato de pescado. La prevalencia de *Cronobacter* spp. en fórmulas infantiles de leche ha disminuido hasta el 1-2% (Iversen y Forsythe, 2004; Chap *et al.*, 2009; EFSA y ECDC, 2019), debido probablemente a las buenas prácticas de fabricación e higiene. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Vojkowska *et al.* (2016) en la República Checa, se obtuvieron 38 muestras de verduras y vegetales (9,6%) positivas a *Cronobacter* spp. Asimismo, Ueda (2017) detectó *Cronobacter* spp. en 7 (12%) hortalizas de campo (espinacas, zanahoria, nabo, tomates cherry y quingombó), en 7 (13%) verduras de cultivos hidropónicos (hojas de zanahoria, brotes de soja y alfalfa) y en 4 (44%) mezclas de hortalizas ralladas LPC. Otro estudio en verduras y otras hortalizas frescas de mercados de China mostró las siguientes prevalencias: lechuga, 29,89% (26/87); cilantro, 52,81% (47/89); tomate, 12,50% (13/104); y pepino, 29,27% (36/123). Por el contrario, Aksu *et al.* (2019) no aislaron *Cronobacter* spp. en ninguna de las 52 muestras analizadas de frutas y vegetales.

Retomando nuestro positivo en la ensalada de lechuga y maíz, de las 81 muestras de segundos platos, solo 14 tenían ensalada como guarnición (y solo 3 tenían maíz), lo que significa una prevalencia de *Cronobacter* spp. del 7,12% en hortalizas frescas. Brandao *et al.* (2017), aislaron *Cronobacter* spp. en el 66,7% de las harinas analizadas. Entre las harinas estudiadas había 11 harinas de maíz de las que 9 resultaron contaminadas, demostrando que este cereal puede ser reservorio de *Cronobacter* spp.

No hay que olvidar la posibilidad de contaminación cruzada debido a la persistencia de *Cronobacter* spp. en superficies, cuando se comparte la misma zona de preparación para las fórmulas infantiles y el resto de ingredientes de los menús de iniciación y menús completos. Así lo demostraron Maçi *et al.* (2016), que aislaron *Cronobacter* spp. en 2 muestras ambientales (3%) tomadas a partir de utensilios y superficies en la cocina de una unidad de cuidados intensivos neonatales donde se preparaban las fórmulas infantiles.

Nuestro estudio, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, ofrece los primeros resultados a nivel nacional de *Cronobacter* spp. en otros alimentos diferentes a las fórmulas infantiles deshidratadas, siguiendo las líneas de investigación de otros estudios internacionales.

Por último, el método elegido para la detección de *Cronobacter* spp. nos parece adecuado y más tras haber participado en cuatro ejercicios de intercomparación (3 organizados por el Gabinete de Servicios para la Calidad y otro por FAPAS) con resultados satisfactorios, por lo que consideramos el método puesto a punto y constituye una motivación para realizar la validación del mismo.

### 3.3.2 Microorganismos indicadores de higiene del proceso

La legislación europea citada no fija unos límites de aceptación para los microorganismos indicadores de higiene del proceso en comidas preparadas, por lo que se hace necesario recurrir a otras referencias como los límites establecidos por normas legales o los reconocidos por la comunidad científica para valorar estos parámetros.

Grupos de investigadores, como Pérez-Silva *et al.* (1998) y Campos *et al.* (2003), tomaron como referencia los límites establecidos por el Real Decreto 3484/2000 actualmente derogados. En nuestra investigación nos hemos basado en los límites de aceptación microbiológica fijados para restauración colectiva en un estudio colaborativo realizado en Italia (Tonucci *et al.*, 2005) que se muestran en la Tabla 1. Esta decisión se basó en que fue un estudio coetáneo del “paquete de higiene” y de los criterios microbiológicos en los productos alimenticios en la UE y a la similitud de los platos elaborados con los de nuestro estudio. De manera general, el 95,91% de las muestras analizadas han sido aceptables, lo que demuestra la eficacia de las prácticas de higiene aplicadas. Nuestros resultados son mejores que los obtenidos recientemente en un estudio sobre las comidas servidas en comedores universitarios de Portugal. En dicho estudio, de las 196 muestras analizadas, solo un 58,33% de los resultados fueron satisfactorios, un 30,77% aceptables y un 10,90% no satisfactorias (Soares *et al.*, 2020a).

#### 3.3.2.1 Recuento de microorganismos indicadores de higiene del proceso en función del tipo de plato y del tratamiento térmico

##### 3.3.2.1.1 Microorganismos aerobios mesófilos totales

Del total de las muestras positivas a AMT, solo 7 platos (2,20%) fueron no aceptables al superar el límite de referencia. De ellos, 3 fueron primeros platos: 1 arroz con tomate (4,08 log UFC/g) y 2 ensaladas de pasta (4,08 log UFC/g y >5,69 log UFC/g, respectivamente); 2 segundos platos: 1 merluza en salsa con ensalada de lechuga y maíz, que superó el umbral superior de detección del sistema TEMPO® (>5,69 log UFC/g), y 1 tortilla con guarnición (ensalada de lechuga con maíz), que presentó un recuento de 5,57 log UFC/g; y 2 purés: 1 de ternera (4,26 log UFC/g) y 1 de verduras (4,23 log UFC/g).

Campos *et al.* (2003) también observaron un porcentaje muy bajo de primeros platos que superaron los límites de AMT, lo que puso de manifiesto que el tratamiento térmico y su conservación fueron adecuados. En nuestro estudio, solo un primer plato con tratamiento térmico y dos purés de inicia-

ción sobrepasaron los límites de referencia para AMT, pero se deberían tomar medidas para disminuir la prevalencia de muestras positivas observada, especialmente en los purés (38,55%) servidos a los niños de más corta edad.

Es frecuente que las hortalizas y frutas frescas contengan niveles altos de AMT en origen, por lo que las guías de calidad microbiológica no establecen límites de referencia para estos microorganismos (Gilbert *et al.*, 2000; Tonucci *et al.*, 2005; HPA, 2009). Los resultados de nuestro estudio confirman este hecho, determinando una mayor prevalencia de AMT en las frutas (53,62%), con un recuento medio de 2,27 log UFC/g. Sin embargo, solo una de las muestras de fruta superó el límite superior de cuantificación de AMT del equipo equipo TEMPO® ( $4,9 \times 10^5$  UFC/g).

En un estudio realizado en Italia (Petruzzelli *et al.*, 2018) durante el período de 2011 a 2015 se analizaron los menús de una producción diferida servidos en guarderías y colegios. El número de muestras analizadas en esos cinco años en las guarderías fue de 452 y los recuentos estuvieron comprendidos entre  $10^1$  y  $10^5$  UFC/g, sin superar ninguno de los platos los límites de referencia de Tonucci *et al.* (2005) para AMT. En otro estudio italiano en guarderías (Marzano y Balzaretto, 2013), un 13,3% de las muestras superaron los citados límites de referencia para AMT.

Si analizamos la presencia de AMT en las muestras según el tratamiento recibido, en más de la mitad de las muestras del grupo B (comidas preparadas sin tratamiento térmico o con tratamiento térmico, pero con algún ingrediente no sometido a tratamiento térmico) se han contabilizado AMT y mostrado diferencias estadísticamente significativas frente a los platos tratados térmicamente (grupo A). Las muestras positivas halladas en las frutas, en los primeros platos con ingredientes vegetales crudos y en aquellos segundos platos que incorporen ensalada de guarnición (grupo B), se pueden deber a que el tratamiento de higienización fue inapropiado para reducir la carga microbiana en origen. En cuanto a la prevalencia del 30% de AMT en los platos del grupo A podría ser indicativa de una contaminación cruzada posterior a la elaboración o un tratamiento térmico insuficiente.

En un estudio llevado a cabo en 6 cocinas de colegios de secundaria de Budapest, abastecidas por un servicio de *catering*, se evaluó si la concentración de AMT en platos calientes precocinados estaba relacionada con las condiciones higiénicas de la cocina. Los resultados mostraron que los niveles de contaminación no estaban influenciados por el tipo de plato o proveedor, pero sí por el nivel de higiene de las instalaciones estudiado previamente (Tóth *et al.*, 2018). Estos resultados confirman el riesgo de la contaminación cruzada post-elaboración en platos tratados térmicamente y la necesidad de una correcta manipulación y control tras su preparación. Estos autores sugirieron realizar una vigilancia regular con ayuda del desarrollo de un sistema de calificación basado en las condiciones higiénicas de la cocina y la carga de AMT de los platos cocinados.

En un estudio recientemente publicado, Soares *et al.* (2020a) obtuvieron unos resultados similares a los nuestros, tanto en platos fríos (pasteles: 1,23 log UFC/g, ensaladas: 3,35 log UFC/g, sándwiches 2,50 log UFC/g), como en platos calientes (arroz: 1,55 log UFC/g, pollo: 1,55 log UFC/g, pescado: 1,63 log UFC/g, carne: 1,11 log UFC/g, pasta: 3,01 log UFC/g, sopas: 1,23 log UFC/g). De acuerdo con los criterios de aceptación de los resultados de Gilbert *et al.* (2000), un 89% de las muestras fueron satisfactorias, un 9% aceptables y un 2% no satisfactorias.

### 3.3.2.1.2 Recuento de enterobacterias

Con relación a las EB, 10 muestras (3,14%) resultaron no aceptables. De los 9 primeros platos analizados en los que se dieron recuento de EB, 2 superaron el límite microbiológico fijado por Tonucci *et al.* (2005). Se trató de una sopa de fideos (3,41 log UFC/g) y una ensalada de pasta (>4,69 log UFC/g). De los segundos platos, superaron el límite de referencia 7 de las 13 muestras positivas, debido principalmente a que 5 de esos segundos platos presentaban como guarnición ensalada. En tres purés se obtuvo recuento de EB, de los cuales un puré de ternera superó el límite de referencia de 2,7 log UFC/g.

Las frutas volvieron a ser el grupo con mayor número de muestras positivas (34,78%) y con el recuento medio más alto (1,21 log UFC/g). Para este tipo de alimento no hay establecidos límites de referencia, pero solo una muestra superó el límite superior de cuantificación de EB del equipo TEMPO® (4,9 x 10<sup>4</sup> UFC/g).

Aunque Tonucci *et al.* (2005) sí establecen unos límites microbiológicos de referencia de EB en hortalizas, otras guías no lo hacen ni tampoco en otros alimentos que contengan estas materias primas como ingredientes. Los autores de estas guías consideran que estos alimentos pueden contener niveles altos de EB como parte de su biota habitual (Gilbert *et al.*, 2000; HPA, 2009). Esta podría ser una de las razones por las que se han obtenido recuentos significativamente más elevados en las frutas para este parámetro, así como en los platos del grupo B (frutas, primeros platos y segundos platos positivos contenían como ingredientes productos frescos).

Por otro lado, es destacable la obtención de resultados no aceptables en platos sometidos a un tratamiento térmico. Cuatro platos del grupo A sobrepasaron los límites de referencia de EB: un primer plato (sopa de fideos, con un recuento de 3,41 log UFC/g); dos segundos platos (cinta de lomo con tomate, con un recuento >4,69 log UFC/g, y pastel de merluza, con un recuento de 4,23 log UFC/g); y un puré de ternera (con 3,74 log UFC/g).

En el trabajo de Soares *et al.* (2020a), se obtuvieron recuentos de EB en platos fríos (pasteles, 0,52 log UFC/g; ensaladas; 2,05 log UFC/g; y sándwiches, 1,06 log UFC/g) y en platos calientes (arroz, 0,41 log UFC/g; pollo, 0,68 log UFC/g; pescado, 1,26 log UFC/g; carne, 0,35 log UFC/g; pasta, 1,18 log UFC/g; y sopas, 0,18 log UFC/g). De las 13 muestras no satisfactorias (6,67%), 7 correspondían a ensaladas, en consonancia con lo hallado en nuestra investigación.

### 3.3.2.1.3 Recuento de coliformes totales

Respecto a los CT, el estudio de Tonucci *et al.* (2005) no establece un valor límite de referencia. Las otras dos guías citadas para la evaluación de la calidad microbiológica en alimentos LPC tampoco establecen límites microbiológicos para CT, al considerar más adecuado el uso de EB como indicador. El principal problema del recuento de CT es que solo se detectan los coliformes fermentadores de lactosa, mientras que las EB están mejor definidas taxonómicamente y los métodos de recuento se basan en propiedades comunes, incluso detectan microorganismos no fermentadores de lactosa como *Salmonella* spp. (Gilbert *et al.*, 2000; HPA, 2009).

Por ello, para comparar nuestros resultados con un valor de referencia nos hemos basado en el umbral máximo seleccionado por Rodríguez *et al.* (2011) en su estudio de comidas refrigeradas LPC (jamón cocido y ensaladas a base de lechuga) en hospitales del sur de España, y en el estudio de Nagla *et al.* (2014) sobre la calidad bacteriológica de los alimentos servidos en colegios brasileños. Estos autores catalogan como insatisfactorios niveles de CT por encima de 3 log UFC/g.

Así, teniendo en cuenta este límite de referencia, 2 primeros platos, 5 segundos platos y un puré de nuestro estudio mostraron resultados no aceptables de CT (2,52%). Es destacable que, de los 5 segundos platos con ensalada de guarnición que superaron el límite para EB, 3 de ellos superaron también el valor de referencia para CT, incluso dos de ellos lo hicieron con resultados superiores al límite superior de cuantificación del equipo TEMPO® ( $4,9 \times 10^4$  UFC/g). Este hecho también se repitió en el primer plato con ingredientes sin tratamiento térmico (ensalada de pasta), que superó el límite superior de cuantificación del equipo TEMPO® tanto para EB como para CT. Rodríguez *et al.* (2011) señalaron en su estudio que los CT pueden alcanzar recuentos altos en los productos vegetales. La prevalencia de este grupo de microorganismos en las frutas (20,29%) fue menor que la hallada para AMT y EB, con recuentos siempre por debajo de 3 log UFC/g.

De la misma manera que hemos descrito para los AMT y EB, los recuentos de CT en los alimentos del grupo B respecto a los del grupo A también han presentado diferencias significativas. Es importante destacar que los 4 platos del grupo A no aceptables por sobrepasar el límite de referencia de EB (sopa de fideos, cinta de lomo con tomate, pastel de merluza y puré de ternera) también presentaron niveles de CT superiores al límite de referencia de Rodríguez *et al.* (2011): 3,23 log UFC/g, 3,57 log UFC/g, 3,78 log UFC/g y 3,61 log UFC/g, respectivamente.

Los recuentos positivos y no aceptables en los primeros y segundos platos de los menús completos y en los purés de los menús de iniciación del grupo A, pueden ser indicadores, como ya se ha recogido anteriormente, de prácticas incorrectas de manipulación, higiene deficiente, tratamiento térmico insuficiente o contaminación cruzada post-elaboración.

### 3.3.2.1.4 Recuento de *Escherichia coli*

Solo 1 muestra (ensalada de pasta) resultó positiva a EC (0,31%). El recuento fue bajo, de 20 UFC/g (1,30 log UFC/g), pero superó el límite establecido en 1,0 log UFC/g para ensaladas de pasta o arroz por Tonucci *et al.* (2005). Gilbert *et al.* (2000) consideran un resultado satisfactorio un recuento <20 UFC/g, aceptable entre 20 y <100 UFC/g, e insatisfactorio  $\geq 100$  UFC/g. La Agencia de Protección para la Salud del Reino Unido establece estos mismos límites (HPA, 2009). Además, esta muestra también sobrepasó los límites superiores de cuantificación del sistema TEMPO® para AMT, EB y CT.

Hay que recalcar que el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 sí establece criterios de higiene del proceso para este parámetro en frutas y hortalizas troceadas LPC, resultando insatisfactoria toda aquella muestra con un recuento superior a 3 log UFC/g.

Estos límites, recomendados y legales, responden a la posibilidad de que la presencia de EC se corresponda a la cepa *E. coli* O157 u otras cepas STEC, que pueden causar un cuadro clínico grave en niños y otras poblaciones de riesgo.

En el estudio de Petruzzelli *et al.* (2018) mejoraron la calidad de las comidas, principalmente en hortalizas frescas, al partir de valores de  $10^4$  UFC/g de EC en 2011 y no ser detectado en los dos últimos años del estudio (2014 y 2015). Marzano y Balzaretto (2013) analizaron 395 muestras de alimentos y solo detectaron EC en 3 muestras de preparaciones multi-ingredientes (mezcla de alimentos cocinados y no cocinados LPC) y en 4 quesos de pasta blanda. Es decir, obtuvieron una prevalencia del 1,77%, pero sorprendentemente EC no se cuantificó en ningún producto vegetal fresco LPC. Al contrario que Soares *et al.* (2020a), que solo obtuvieron recuentos positivos en ensaladas, aunque con un nivel muy bajo.

### 3.3.2.1.5 Recuento de estafilococos coagulasa positivos

En nuestro estudio, se han cuantificado ECP en 14 muestras, todas ellas con un recuento aceptable por debajo del límite de 1,7 log UFC/g establecido por Tonucci *et al.* (2005). Si prestamos atención a la guía de la Agencia de Protección de la Salud del Reino Unido (HPA, 2009) clasifica el riesgo asociado a la concentración de ECP en tres niveles: bajo (<20 UFC/g), moderado (20- $10^4$  UFC/g) y alto ( $>10^4$  UFC/g). En nuestro caso, el máximo nivel de contaminación fue de 21 UFC/g, por lo que la contaminación por ECP no supone una situación de riesgo alto.

Nuestros resultados coinciden con la baja prevalencia encontrada en el estudio portugués de Soares *et al.* (2020a) donde solo una muestra fue no conforme (0,51%) y con otro estudio llevado a cabo en guarderías italianas, donde solo se detectó ECP en dos quesos frescos (0,51%), aunque en este caso la media del recuento de ambas muestras fue de 3,3 log UFC/g (Marzano y Balzaretto, 2013). De la misma manera, en otro estudio italiano, el 98% y 96% de las muestras analizadas en las guarderías durante los años

2011 y 2012, respectivamente, fueron conformes para el límite de referencia de ECP, con unos recuentos comprendidos entre  $<10$  y  $10^2$  UFC/g. En los 3 años siguientes del estudio no se detectó ECP en ninguna muestra (Petruzzi *et al.*, 2018).

Referente a nuestros resultados, es interesante señalar que solo cinco platos del grupo B (4 frutas troceadas y 1 segundo plato con ensalada) presentaron recuento de ECP, por lo que en líneas generales los manipuladores han cumplido con la higiene y buenas prácticas de manipulación en el troceado de frutas. La contaminación de ECP tiene origen humano, ya que *S. aureus* sobrevive bien en la piel por lo que se puede vehicular a través de las manos si no hay una correcta higienización de las mismas y también se transmite a los alimentos en forma de aerosoles al estornudar, toser o hablar (Todd *et al.*, 2009).

Es más llamativo que los otros nueve recuentos hayan tenido lugar en platos del grupo A, principalmente en purés para los lactantes y en cremas de los menús completos. No obstante, como se ha indicado previamente, no son niveles de contaminación preocupantes. Asumiendo que estos platos han recibido un tratamiento que asegure la destrucción de la bacteria y de su toxina, la presencia de ECP podría deberse a una contaminación posterior a su elaboración. En este tipo de establecimientos, los manipuladores de alimentos simultanean tareas de cuidado de los bebés con la manipulación de alimentos, pudiendo el comportamiento infantil favorecer la diseminación de los microorganismos del tracto respiratorio.

En todo caso, hay que extremar la higiene personal y las buenas prácticas de manipulación elaborando los platos con la mínima antelación y conservándolos protegidos a la temperatura adecuada. Un tratamiento térmico insuficiente o unas condiciones de conservación inadecuadas pueden permitir a *S. aureus* proliferar hasta un nivel de  $10^5$  UFC/g, que es la carga mínima para producir entre 20 ng y 1  $\mu$ g de enterotoxina estafilocócica. Esta cantidad de toxina es suficiente para desencadenar el cuadro clínico de intoxicación por *S. aureus* (Salandra *et al.*, 2008).

En el estudio de Trafialek *et al.*, (2019), la higiene y prácticas de los manipuladores fue uno de los aspectos identificados para mejorar urgentemente. Hay evidencias de que la formación de manipuladores de alimentos es efectiva, relacionando los resultados en las mejoras de higiene con la calidad microbiológica de los productos preparados (Acikel *et al.*, 2008; Garayoa *et al.*, 2014). Sin embargo, también se ha encontrado que los manipuladores que han recibido una formación de buenas prácticas no siempre lo traducen en una mejora en su comportamiento y hábitos (Roberts *et al.*, 2008), por lo que la formación se debe repetir a lo largo del tiempo para evitar la pérdida de los conocimientos adquiridos (Furnari *et al.*, 2002).

Por tanto, no hay que olvidar que los menús van destinados a una población vulnerable y la formación continua de los manipuladores de alimentos en búsqueda de una mejora constante es crucial.

### 3.3.2.2 Investigación de patógenos y recuento de microorganismos indicadores de higiene del proceso en los platos sin tratamiento térmico

Como muestran los resultados discutidos anteriormente, y como era de esperar, los platos sin tratamiento térmico resultaron los más contaminados. El tipo de plato con mayor número de muestras positivas fueron las frutas. Los segundos platos con ensalada de guarnición presentaron el mayor número de resultados no aceptables, respecto a los límites microbiológicos establecidos por Tonucci *et al.* (2005). En este grupo de alimentos (grupo B) también hay que destacar los resultados no aceptables obtenidos en varios primeros platos (ensalada de pasta, ensalada de arroz y ensalada de garbanzos).

Soares *et al.* (2020a) han obtenido resultados similares en el estudio de las comidas servidas en comedores de universidades portuguesas. Los platos fríos (ensaladas y sándwiches) fueron los más contaminados y observaron diferencias significativas en la calidad microbiológica respecto a los platos calientes.

#### 3.3.2.2.1 Ensaladas

Las hortalizas que forman parte de las ensaladas LPC son muy apreciadas por el consumidor debido a los aportes nutricionales. Sin embargo, pueden presentar una alta contaminación microbiana que no será reducida o eliminada al no sufrir un tratamiento térmico posterior. Además, pueden estar sujetas a un deficiente procedimiento de higienización, a contaminación cruzada por unas prácticas de manipulación incorrectas o a un uso indebido de las temperaturas durante su preparación, mantenimiento y distribución.

Respecto a los patógenos, solo se detectó *Cronobacter* spp. en una ensalada (7,12%) de lechuga y maíz. Tanto el estudio de Brandao *et al.* (2017) como el previo de Schmid *et al.* (2009), en el que observaron la colonización de *Cronobacter* spp. en las raíces de maíz y tomate, evidenciaron que las plantas pueden ser el hábitat natural de *Cronobacter* spp. Por ello, estos productos que no son sometidos a tratamiento térmico pueden representar un peligro para los niños y otras poblaciones de riesgo.

Osimani *et al.* (2015) evaluaron durante 9 años la calidad microbiológica de las ensaladas preparadas en un comedor universitario. Al igual que nosotros, tampoco detectaron *Salmonella* spp. ni *L. monocytogenes*. Soares *et al.* (2020a) tampoco detectaron patógenos (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *Clostridium* spp.) en las 17 ensaladas analizadas.

Sin embargo, otro estudio sí detectó *L. monocytogenes* (3,7%) y *Salmonella* spp. (0,9%) en 118 ensaladas frescas LPC procedentes de restaurantes (Faour-Klingbeil *et al.*, 2016). Si bien hay que destacar, que la presencia de estos patógenos se asoció a restaurantes sin lavamanos ni pilas para lavar y desinfectar hortalizas o con zonas inadecuadas de almacenamiento.

Varios grupos de investigación han incluido también en los análisis de ensaladas patógenos formadores de esporas, como son *Bacillus cereus* (BC)

y *Clostridium* sulfito reductores (CSR). Soares *et al.* (2020a) encontraron un recuento bajo de BC (0,16 log UFC/g) y no detectaron CSR en ninguna muestra. Sin embargo, Osimani *et al.*, (2015) reportaron una prevalencia de alrededor del 30% de muestras con BC que excedían el límite de referencia (<2 log UFC/g), con rangos de 2,8 a 4,1 log UFC/g. En este estudio, la presencia de CSR fue esporádica al detectarse solo una muestra positiva en los 9 años de investigación. En el estudio de Petruzzelli *et al.* (2018), de las 620 muestras que analizaron, uno de los hallazgos más significativos con necesidad de medidas correctoras fue la alta prevalencia de BC en vegetales crudos y cocinados, superando en algunos casos los límites de referencia. En el caso de CSR todas las muestras se situaron por debajo de 10 UFC/g.

En lo que se refiere a los microorganismos indicadores de higiene del proceso, durante nuestro estudio se recibieron 14 segundos platos acompañados de guarnición a base de ensalada. En 10 de esas muestras (71,42%) se obtuvo recuento positivo en, al menos, uno de los parámetros analizados, con una media de 3,48 log UFC/g de AMT; 2,78 log UFC/g de EB; 2,07 log UFC/g de CT; y 0,73 log UFC/g de ECP y 5 de ellas resultaron no aceptables (35,71%). Respecto a los primeros platos, seis recetas de ensaladas frías presentaron recuentos positivos, destacando una ensalada de pasta que superó los límites de referencia de Tonucci *et al.*, (2005) para AMT, EB y CT y, además, fue la única muestra de todo el estudio en la que se detectó *E. coli*.

En la literatura científica se pueden encontrar estudios microbiológicos sobre verduras y otras hortalizas LPC, como los desarrollados por Osimani *et al.* (2015) y Faour-Klingbeil *et al.* (2016). En el primero de ellos no se detectó EC, los AMT superaron el límite establecido por las guías nacionales italianas de 5,7 UFC/g en el 38,5% de las muestras, los CT también se cuantificaron con rangos de entre 3,1 y 5,6 UFC/g y solo 4 muestras de las 48 analizadas superaron el límite de referencia para *S. aureus* (Osimani *et al.*, 2015). En la investigación de Faour-Klingbeil *et al.* (2016) sobre ensaladas LPC de restaurantes libaneses, los AMT se contabilizaron entre 2,90 y 7,38 log UFC/g (el 17% de las muestras por encima de 7 log UFC/g). Para los CT, la prevalencia fue del 79,6% y el intervalo entre 1,72 y 6,40 log UFC/g. El porcentaje de muestras con recuento para EC fue del 31,3% (rango entre 1 y 7,15 log UFC/g) y para *S. aureus* del 41,5%.

Por su parte, Soares *et al.* (2020a) informaron de los siguientes niveles de contaminación de microorganismos indicadores en ensaladas: AMT 3,35 log UFC/g; EB 2,05 log UFC/g; EC 0,06 log UFC/g; ECP 0,22 log UFC/g.

En España, también se ha investigado este tipo de productos, como en el trabajo realizado sobre ensaladas servidas en comedores escolares (Rodríguez-Caturla *et al.*, 2012). Se obtuvieron recuentos medios de AMT por debajo de 6 log UFC/g, de CT por debajo de 4 log UFC/g, de ECP por debajo de 2 log UFC/g y un 5% de muestras positivas para EC. No se detectaron ni *Samonella* spp. ni *Listeria* spp.

Según Aycicek *et al.* (2006), recuentos elevados de AMT en hortalizas no son indicativos de riesgo para la salud, pero podrían ser un indicador de una baja calidad microbiológica en ensaladas LPC. La carga alta de AMT puede provenir de fuentes ambientales durante las diferentes fases de manipulación, cortado y almacenamiento (Abadias *et al.*, 2008). Los CT pueden proceder de malas prácticas durante la recolección, el almacenamiento y la distribución (Rodríguez-Caturla *et al.*, 2012). Además, las hortalizas frescas tratadas con cloro todavía pueden albergar niveles altos de CT (5,9 log UFC/g) (Nguz *et al.*, 2005). En otros estudios encontraron recuentos inferiores a 1 log UFC/g de EB tras el lavado de lechuga en una solución de cloro activo (Martínez-Tomé *et al.*, 2000; Meldrum *et al.*, 2009).

La presencia de EC en los alimentos indica unas prácticas y condiciones higiénicas deficitarias (Faour-Klingbeil *et al.*, 2016). Doyle y Erickson (2006), concluyeron que EC es un mejor indicador de contaminación fecal que los CT, puesto que dentro de este grupo puede haber especies de origen no fecal. Esta bacteria también puede comportarse como patógeno, especialmente si aparecen las cepas STEC. El lavado de algunos vegetales puede ser insuficiente, como demostraron Shaw *et al.* (2008) con la adhesión de STEC O157:H7 y O26:H11 a las espinacas a través de su factor de virulencia EspA. Saldaña *et al.* (2011) también describieron la internalización de estas cepas en el tejido de las hojas de espinacas y Brandl *et al.* (2008) concluyeron que las hojas dañadas de lechuga favorecen la multiplicación de STEC O157:H7 más rápidamente que las superficies de hojas intactas.

La aparición de *S. aureus* se puede deber a que los manipuladores sean portadores y por malas prácticas de higiene contaminen los vegetales y las superficies de contacto a través de sus manos o secreciones (Gilbert *et al.*, 2000).

### 3.3.2.2.2 Frutas

Las frutas frescas se caracterizan por tener superficies de corte no estériles, ser ricas en nutrientes y agua y no ser sometidas a un tratamiento térmico o proceso químico de conservación (Olaimat y Holley, 2012). Las frutas contienen microorganismos que están presentes en la naturaleza y se contaminan por ellos durante la pre-cosecha y operaciones de post-cosecha y procesado. Si se dan las condiciones favorables, estos microorganismos proliferarán y producirán el deterioro de las frutas e incluso problemas de salud si los microorganismos son patógenos (Beuchat, 2002).

En nuestro estudio, las frutas han resultado ser el tipo de alimento con mayor prevalencia de contaminación por AMT, EB y CT con unos recuentos medios de 2,27 log UFC/g, 1,21 log UFC/g y 0,92 log UFC/g, respectivamente. No obstante, aunque no hay límites de referencia para determinar su aceptabilidad, solo una muestra superó los límites superiores de cuantificación de AMT y EB del equipo equipo TEMPO®.

Hay numerosos estudios sobre la calidad microbiológica de frutas frescas mínimamente procesadas. Graça *et al.* (2017) obtuvieron recuentos en diferen-

tes frutas de supermercados de Portugal, con rangos de entre 3 y 9,2 log UFC/g para AMT. Abadías *et al.* (2008) publicaron intervalos inferiores (2-7,1 log UFC/g) en frutas comercializadas en España. Los valores de CT, en el estudio portugués, se situaron entre <1 y 9,1 log UFC/g y en el estudio español se analizaron EB resultando el intervalo entre 1,7 y 4,8 log UFC/g. Otro estudio de Graça *et al.* (2015) valoró la calidad microbiológica de manzanas frescas cortadas. Los valores obtenidos fueron los siguientes: AMT 3,3-8,9 log UFC/g, CT 1,8-7,6 log UFC/g, y un 5% de las muestras analizadas presentaron cargas de ECP entre 1 y 3 log UFC/g.

En ninguno de los tres estudios anteriores (Abadías *et al.*, 2008; Graça *et al.*, 2015; Graça *et al.*, 2017) se detectó EC, *Salmonella* spp. ni *L. monocytogenes*. Graça *et al.* (2015) investigaron también el patógeno emergente *C. sakazakii* en las manzanas frescas cortadas, sin que fuera hallado en ninguna muestra.

En nuestra investigación no se ha detectado ningún patógeno en frutas. Es un hecho de gran relevancia puesto que hay estudios que muestran cómo diferentes bacterias patógenas (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y EC productoras de toxina Shiga) pueden sobrevivir y crecer en frutas frescas (Berger *et al.*, 2010; Alegre *et al.*, 2010).

### **3.3.2.3 Recuento de microorganismos indicadores de higiene del proceso en función del modelo de gestión del servicio de alimentación**

La prevalencia de positivos de AMT, EB y CT en las muestras analizadas provenientes de cocinas de GD fue mayor que en las cocinas de GC, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los recuentos según el modelo de gestión. Es importante señalar que el tamaño muestral no estaba balanceado, al analizarse casi 3 veces más muestras de GD debido a que esta modalidad es la más habitual en los CEI del Ministerio de Defensa.

En el estudio microbiológico de Campos *et al.* (2003) en comidas preparadas de comedores escolares en Tenerife, no se encontraron diferencias significativas según el tipo de gestión. Además, en ambos tipos de cocina las ensaladas y otras guarniciones (salsas, patatas y otras hortalizas) fueron el tipo de plato con un mayor porcentaje de muestras no aptas. Las ensaladas presentaron las prevalencias más elevadas en los parámetros estudiados (el 91% para AMT, 89% para EB y 24% para EC). En los alimentos del grupo B encontraron que el número de muestras con recuento, tanto en GD como en GC, fue superior en todos los parámetros en comparación con los del grupo A. Finalmente, *S. aureus* solo fue aislado en 3 alimentos (una ensaladilla, un salpicón de atún y un segundo plato de pollo). Todos estos resultados de los comedores escolares de Tenerife, concuerdan en gran medida con los hallazgos de nuestro estudio, si tenemos en cuenta que ellos no analizaron ninguna fruta.

Los estilos de vida adquiridos en los últimos años han provocado que la restauración colectiva haya aumentado en los centros de trabajo, educativos, hospitalarios y en el sector lucrativo. Los niños en edad preescolar y escolar

se consideran población de riesgo y un número cada vez mayor de ellos realiza, al menos, una comida diaria en el comedor escolar. Gran parte de estos centros educativos se apoya en un servicio de *catering* que realiza los menús en cocinas centrales, por lo que numerosos estudios han evaluado la calidad microbiológica de los platos preparados en ellas con el fin evaluar la elaboración y el mantenimiento durante el transporte y la manipulación de los mismos (Marzano y Balzaretto, 2013; Garayoa *et al.*, 2014; Tóth *et al.*, 2018; Petruzzelli *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2020a).

Ciertas características propias de los servicios de *catering*, como la gran cantidad de materias primas utilizadas y de comidas elaboradas, la preparación de los platos con antelación, el transporte y conservación a diferentes temperaturas, entre otras, hace pensar que la calidad del producto final puede ser inferior a la de las comidas preparadas en una cocina propia. En nuestro estudio solo 13 platos obtuvieron resultados no aceptables al menos en uno de los parámetros estudiados. Ninguno de los platos calientes (primeros y segundos platos de los menús completos y purés de los menús de iniciación) no aceptables procedía de GC, lo que indica una buena manipulación y transporte de los mismos. Sin embargo, esta modalidad de servicio presentó más resultados no aceptables en los platos sin tratamiento térmico (segundos platos con ensaladas de guarnición). Este hallazgo se podría achacar a unos ineficientes procedimientos de desinfección o a una contaminación posterior durante el transporte y/o mantenimiento a temperatura no regulada.

#### **3.3.2.4 Recuento de microorganismos indicadores de higiene del proceso en función de la estación del año**

Los resultados de nuestro trabajo muestran que el invierno fue la estación del año de menor prevalencia en el recuento de los microorganismos indicadores estudiados. Durante el mes de invierno se presentaron diferencias estadísticamente significativas al obtener un recuento más bajo de AMT, EB y CT frente al mes de otoño y de AMT en comparación con los resultados de verano. Estos datos podrían estar relacionados con las temperaturas ambientales más bajas. En contrapartida, en otoño se obtuvieron los recuentos más altos de AMT, EB y CT, que podrían asociarse con una posible incorporación de nuevos manipuladores de alimentos al inicio del curso y a que en las zonas geográficas de donde provenían las muestras (CEI de Andalucía y Canarias) todavía se alcanzaran altas temperaturas ambientales en esos meses.

En el estudio de Pérez-Silva (1998) en comedores colectivos de alto riesgo, entre los que se incluían 16 guarderías, investigaron la relación entre la presencia de AMT y la época del año en la que se realizó la toma de muestras. A diferencia de nuestros resultados, sorprendentemente se detectaron más AMT durante los meses fríos.

En un estudio reciente sobre la prevalencia de agentes causantes de toxiinfecciones en establecimientos alimentarios de la República Checa (comedores escolares entre ellos), detectaron que la presencia de EC, *S. aureus* y BC

era dependiente de la estación del año. La primera bacteria se detectó más en verano, mientras que *S. aureus* fue en esta estación y otoño cuando presentó una menor prevalencia. Finalmente, la presencia de BC fue mayor en otoño, invierno y primavera en comparación con verano. Una posible explicación para que hubiera mayor presencia de bacterias en los meses más fríos sería el tipo de ventilación. Así, en verano se utilizan sistemas de aire acondicionado y en invierno la apertura de ventanas crean corrientes de aire cuyas partículas de polvo pueden transportar BC (Bogdanovičová *et al.*, 2019).



## **CAPÍTULO IV**

---

# **VALORACIÓN DE LA CALIDAD NUTRICIONAL Y DIETÉTICA DE LOS MENÚS INFANTILES**



## CAPÍTULO IV. VALORACIÓN DE LA CALIDAD NUTRICIONAL Y DIETÉTICA DE LOS MENÚS INFANTILES

El **objetivo** específico de este capítulo es valorar la calidad nutricional y dietética de los menús servidos en base a las recomendaciones de organismos de referencia a nivel nacional e internacional.

Para el desarrollo de este objetivo se ha valorado la adecuación a las recomendaciones del aporte energético, de los nutrientes y del perfil calórico y lipídico. Por otro lado, se han evaluado aspectos de la composición y variedad de la dieta, como la frecuencia de consumo de los distintos grupos de alimentos, la rotación de alimentos dentro de los mismos y la variedad de las recetas y de las técnicas culinarias. Estos aspectos cuantitativos y cualitativos se han comparado en función de la modalidad de gestión del servicio de alimentación. También se han considerado otras recomendaciones facilitadas en los menús.

### 4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1.1 Diseño

Se llevó a cabo un estudio observacional transversal de la calidad nutricional de los menús ofertados en los 25 CEI del Ministerio de Defensa, cuyo servicio de alimentación estaba adjudicado a una misma empresa, durante el año 2017 (de enero a julio del curso 2016-2017 y de septiembre a diciembre del curso 2017-2018).

#### 4.1.2 Descripción de la muestra

La empresa adjudicataria diseñaba mensualmente el mismo menú para 20 CEI que disponían de cocina propia (GD). Para los otros 5 CEI, que no disponían de cocina propia, tenía subcontratado un servicio de *catering* (GC) que diseñaba otro menú diferente y lo elaboraba en una cocina central para luego ser distribuido.

Los usuarios de estos comedores tenían edades comprendidas entre los 6 meses y 3 años, por lo que se ofrecía un menú de iniciación a base de purés y otro menú completo formado por un primer plato, un segundo plato y el postre. Tanto en GD como en GC se elaboraban 4 menús de iniciación que se servían de forma rotatoria (Tabla 47). Los postres en los menús de iniciación de GD estaban constituidos por un puré de frutas (manzana, pera, plátano, zumo de naranja y galleta) al que se le iba incorporando yogur cuando el niño podía tomar leche de vaca conforme a su edad, madurez y evolución o por indicación del pediatra. En el caso de los postres de GC, se ofrecía un yogur natural o de frutas.

**Tabla 47.** Menús de iniciación.

Gestión	Menús de iniciación			
<b>GD</b>	Puré de verduras con pollo	Puré de verduras con pescado blanco	Puré de verduras con ternera	Puré de legumbres
<b>GC</b>	Puré de verduras y otras hortalizas con pavo	Puré de verduras y otras hortalizas con ternera	Puré de verduras y otras hortalizas con pollo	Puré de verduras y otras hortalizas con pescado

GD: Gestión directa. GC: Gestión contratada.

Respecto a los menús completos, se estudiaron nutricionalmente 226 menús de GD y 222 menús de GC correspondientes a 11 meses del año 2017 (excluido el mes de agosto por vacaciones escolares). En cuanto a la composición y variedad de los menús completos, se basaba en las recomendaciones de la Guía de comedores escolares del Programa PERSEO, tal como se detalla en la Tabla 48. Con el menú se ofrecía una ración de pan blanco y agua como única bebida.

**Tabla 48.** Estructura ideal de un menú saludable (MISACO, 2018).

Primer plato	Segundo plato	Guarnición	Postre	Complemento
Verduras y hortalizas	Carne o pescado o huevo	Patatas, pasta, arroz, legumbres, maíz, etc.	Fruta	Lácteos
Patatas, pasta, arroz, legumbres, maíz, etc.	Carne o pescado o huevos	Verduras y hortalizas	Fruta	Lácteo

#### 4.1.3 Análisis cuantitativo de los menús: energía y nutrientes

La composición cuantitativa de los menús se determinó a través de las planillas y fichas técnicas facilitadas por la empresa adjudicataria y la subcontratada de *catering*, que incluían los ingredientes y las cantidades de cada componente utilizados en la elaboración de los platos. A partir de estos datos, se calculó la cantidad media ofertada en cada ración y, mediante el programa para valoración de dietas y cálculos de alimentación DIAL® (Ortega *et al.*, 2016), se estimó la ingesta de energía, macronutrientes y micronutrientes.

El programa DIAL® dispone de una tabla de composición nutricional de alimentos, que recoge una información sobre la composición en energía, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, fibra, minerales, vitaminas, colesterol, ácidos grasos, aminoácidos, etc. (hasta 140 componentes distintos) de los alimentos más habituales. Las cantidades de los ingredientes facilitadas de los menús de GD estaban ajustadas a edad preescolar. Sin embargo, en el

caso de los menús completos de GC, los datos de gramajes facilitados por la empresa correspondían a los empleados para la elaboración de los menús de niños de 6-9 años de edad, por lo que se aplicó una corrección del 65% al resultado obtenido en el programa DIAL®, siguiendo las recomendaciones de la propia empresa que estimaban necesario entre un 60-70%.

Para valorar los datos obtenidos del contenido energético, de proteína y micronutrientes se compararon con las recomendaciones nutricionales para los grupos de edad de 7-12 meses y 1-3 años de las Tablas de Composición de Alimentos de Moreiras *et al.* (2018) (Tabla 49).

**Tabla 49.** Ingestas diarias recomendadas de energía, proteínas, vitaminas y minerales para la población preescolar (Moreiras *et al.*, 2018).

<b>Energía y nutrientes</b>	<b>7-12 meses</b>	<b>1-3 años</b>
Energía (kcal/d)	950	1250
Proteínas (g/d)	20	23
Tiamina (mg/d)	0,4	0,5
Rlboflavina (mg/d)	0,6	0,8
Eq de niacina (mg/d)	6	8
Vitamina B6 (µg/d)	0,5	0,7
Folato (µg/d)	60	100
Vitamina B12 (µg/d)	0,3	0,9
Vitamina C (mg/d)	50	55
Eq de retinol (µg/d)	450	300
Vitamina D (µg/d)	10	15
Vitamina E (mg/d)	6	6
Vitamina K (µg/d)	2,5	30
Calcio (mg)	525	600
Hierro (mg)	7	7
Yodo (µg)	45	55
Zinc (mg/d)	5	10
Magnesio (mg/d)	85	125
Potasio (mg/d)	700	800
Fósforo (mg/d)	250	400
Selenio (µg/d)	15	20

Para evaluar la adecuación de la ingesta de energía (el almuerzo escolar debe aportar una tercera parte de la energía total diaria) y la contribución de los macronutrientes al aporte energético total diario se tuvieron en cuenta las directrices de la Guía de comedores escolares del Programa PERSEO, que se recogen en la Tabla 50 (MISACO, 2008).

**Tabla 50.** Recomendaciones para evaluar el perfil calórico (MISACO, 2008).

Nutrientes	% de la Energía Total
Hidratos de carbono	50-60%
Azúcares sencillos	<10%
Proteínas	12-15%
Lípidos	30-35%
Colesterol	100 mg/1000 kcal (o 300 mg/día)

Otros indicadores utilizados para determinar la calidad de la dieta fueron el perfil lipídico, expresado como el porcentaje de energía aportado por los diferentes tipos de AG con respecto al total de la energía ingerida (Tabla 51) y la calidad de la grasa, definida por el tipo de AG y su distribución en el componente lipídico, evaluado por diferentes índices o relaciones entre los AG (Tabla 52).

**Tabla 51.** Objetivos nutricionales para evaluar el perfil lipídico.

Ácidos grasos	Serra y Aranceta (2011)	Ortega et al. (2014b)	Moreiras et al. (2018)
AGS (% Energía)	7-8%	<10%	<7-8%
AGPI (% Energía)	5%	4-10%	5%
AGMI (% Energía)	20%	15-20%	20%

**Tabla 52.** Objetivos nutricionales para valorar la calidad de la grasa (Serra y Aranceta, 2011).

Calidad de la grasa	Objetivo
AGPI $\omega$ -6 (% Energía)	3%
AGPI $\omega$ -3 (% Energía)	1-2%
DHA	300 mg
AG <i>trans</i> (% Energía)	<1%
Relación $\omega$ -6/ $\omega$ -3	<4:1
AGPI/AGS	$\geq 0,5$
AGPI + AGMI/AGS	$\geq 2$

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.  $\omega$ : omega. DHA: Ácido docosahexaenoico. AG: Ácidos grasos. AGS: Ácidos grasos saturados. AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados.

#### 4.1.4 Estudio de la composición y variedad de los menús completos

Para la evaluación de la frecuencia de oferta de los distintos grupos de alimentos en los menús completos se analizó la información que figuraba en las planillas de los ciclos de menús (menús del mes escolar correspondientes a 20 días lectivos aproximadamente) facilitadas por la empresa adjudicataria y la subcontratada de *catering* que incluían primer plato, segundo plato (normalmente con guarnición) y postre. Se contabilizó como ración de un alimento los ingredientes principales de los platos, considerando que el tamaño de la porción ofertada se ajustaba al rango de edad de los comensales. Una vez

transformados todos los platos del ciclo de menús en raciones, se sumaron por grupos de alimentos y se compararon con el número de raciones recomendadas en el DoCACE (MSPSI, 2010), que se muestran en la Tabla 53. Estas recomendaciones semanales, que se corresponden a 5 días lectivos, fueran extrapoladas a recomendaciones mensuales (20 días lectivos) para la discusión de nuestros resultados, en la línea de lo realizado por otros estudios (Vergara *et al.*, 2016; Llorens-Ivorra *et al.*, 2016; Valero, 2017).

**Tabla 53.** Frecuencias de consumo recomendadas en los menús de los centros educativos (MSPSI, 2010).

Grupos de alimentos	Frecuencia semanal
<b>Primeros platos</b>	
Arroz	1
Pasta <sup>1</sup>	1
Legumbres	1-2
Hortalizas y verduras (incluyendo las patatas)	1-2
<b>Segundos platos</b>	
Carnes	1-3
Pescados	1-3
Huevos	1-2
<b>Guarniciones</b>	
Ensaladas variadas	3-4
Otras guarniciones (patatas, hortalizas, legumbres)	1-2
<b>Postres</b>	
Frutas frescas y de temporada	4-5
Otros postres (preferentemente yogur, queso fresco, cuajada, frutos secos, zumos naturales,...)	0-1

<sup>1</sup> En las pastas no se incluyen las pizzas porque, salvo excepciones, se consideran platos precocinados.

La guía también recomienda limitar el uso de productos precocinados a una frecuencia máxima de tres veces al mes.

También se efectuó una valoración del grado de cumplimiento de los siguientes criterios de variedad de los menús del comedor escolar recomendados en la Guía de comedores escolares del Programa PERSEO: rotación mensual de alimentos para un mismo grupo de alimentos, variedad de las recetas con el objetivo de no repetir una misma receta en la misma semana o entre dos semanas consecutivas, y variedad de los procesos culinarios (hervido, guiso, horneado, plancha y fritura) (MISACO, 2008).

En la Tabla 54 se muestra la variedad de alimentos dentro de un mismo grupo y de procesos culinarios.

**Tabla 54.** Número de alimentos distintos por grupo y número de procesos culinarios distintos por grupo ofertados al mes (MISACO, 2008).

Grupo de alimentos	n.º de alimentos distintos por grupo ofertados al mes	n.º de procesos culinarios distintos por grupo ofertados al mes
Verduras y otras hortalizas	4-5	3-4
Legumbres, patatas, pasta y arroz	6-8	3-4
Carnes y derivados	3-4	2-3
Pescados	3-4	2-3
Huevos	N/A	2
Frutas	4	N/A

N/A: No aplica.

#### 4.1.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables cuantitativas mediante medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar), expresadas como  $\bar{x}$  (DE).

Se determinó la normalidad de las distribuciones de las variables dependientes cuantitativas con la prueba de Kolgomorov-Smirnov. La homogeneidad de las varianzas se analizó con el test de Levene. Posteriormente, para determinar la asociación entre la variable independiente dicotómica (GD/GC) y dependiente cuantitativa de distribución paramétrica, se empleó el test t de Student. El efecto fue valorado mediante la diferencia de medias, y la precisión mediante el intervalo de confianza del 95%. Como grado de significación estadística se empleó un valor de  $p < 0,05$ .

La aplicación informática utilizada fue el paquete IBM®SPSS® Statistics versión 24.

## 4.2 RESULTADOS

### 4.2.1 Análisis cuantitativo de los menús: energía y nutrientes

En las Tablas 55 y 56 se muestra el contenido medio ( $\pm$  DE) de energía y de macronutrientes, colesterol y fibra de los menús de iniciación y menús completos, respectivamente, evaluados a lo largo de todo el año 2017 en los CEI del Ministerio de Defensa.

**Tabla 55.** Contenido de energía y macronutrientes, colesterol y fibra de los menús de iniciación según el modelo de gestión.

Nutriente	Gestión directa (n=4)		Gestión contratada (n=4)	
	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx
Energía (kcal)	247,50 (32,46)	219,00-294,00	322,25 (22,28)	294,00-347,00
Proteínas (g)	9,18 (1,77)	7,40-11,30	17,90 (2,64)	15,70-21,70
Lípidos (g)	7,90 (0,81)	7,20-8,60	17,10 (1,53)	14,90-18,20
Colesterol (mg)	17,80 (9,87)	3,30-25,20	53,98 (9,06)	42,30-63,90
Glúcidos (g)	31,63 (6,05)	28,50-40,70	22,20 (0,00)	22,20-22,20
Fibra (g)	6,88 (2,55)	5,60-10,70	4,10 (0,00)	4,10-4,10

**Tabla 56.** Contenido de energía y macronutrientes de los menús completos según el modelo de gestión.

Nutriente	Gestión directa (n=226)		Gestión contratada (n=222)		p
	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	
Energía (kcal)	476,72 (52,49)	350,00-589,00	448,98 (51,43)	320,45-614,90	<0,001
Proteínas (g)	18,37 (3,78)	11,10-28,32	19,61 (3,91)	8,84-30,55	0,001
Lípidos (g)	17,91 (4,64)	8,19-28,48	18,90 (4,39)	9,36-30,88	0,021
Colesterol (mg)	90,34 (71,59)	1,40-256,00	59,27 (34,49)	8,78-225,55	<0,001
Glúcidos (g)	56,07 (8,32)	35,91-71,00	46,61 (8,54)	21,45-72,15	<0,001
Fibra (g)	7,82 (2,02)	4,4-12,80	7,04 (2,85)	4,4-14,50	<0,001

p: Valor significativo

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el aporte energético en función del modelo de gestión, con 27,74 kcal más en los menús completos de GD (IC 95%: 18,08-37,41) que en los menús completos de GC. En las proteínas y lípidos también se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En este caso fueron los menús de GC los que aportaron 1,24 g más (IC 95%: 0,52-1,96) y 0,98 g más (IC 95%: 0,15-1,83), respectivamente. Sin embargo, en la cantidad de colesterol se encontraron diferencias significativas en los menús de GD, con una media de 31,06 mg más (IC 95%: 20,65-41,48). Respecto a los glúcidos y fibra también presentaron diferencias significativas en los menús de la modalidad de GD, con 9,46 g más (IC 95%: 7,89-11,03) y 0,78 g más (IC 95%: 0,32-1,24), respectivamente.

En la Tabla 57 se recoge el aporte energético medio, mínimo y máximo mensual de los menús completos en cada modalidad de servicio.

**Tabla 57.** Contribución (%) a las necesidades diarias de energía, por meses, de los menús completos según el modelo de gestión.

Mes	Gestión directa (n=226)		Gestión contratada (n=222)	
	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx
Enero	37,12 (4,22)	28,72-43,36	37,20 (3,58)	28,96-42,95
Febrero	37,07 (4,63)	31,04-47,12	35,19 (4,02)	25,64-40,61
Marzo	37,58 (4,58)	28,00-44,88	35,17 (4,22)	29,38-43,26
Abril	36,90 (4,52)	31,04-46,08	36,02 (4,49)	27,25-46,80
Mayo	40,00 (2,70)	34,08-44,56	35,63 (4,46)	26,94-49,19
Junio	38,77 (4,47)	30,64-44,76	35,62 (4,07)	28,24-47,53
Julio	39,49 (3,38)	30,64-44,40	35,60 (3,45)	27,92-42,95
Septiembre	38,14 (4,52)	30,64-44,40	36,71 (4,47)	30,68-46,59
Octubre	38,28 (4,30)	30,64-45,52	36,85 (4,35)	29,12-46,80
Noviembre	37,78 (4,28)	30,64-44,40	35,39 (4,43)	28,44-45,66
Diciembre	38,16 (3,96)	30,40-44,23	35,64 (4,06)	29,59-46,44
<b>Contribución anual</b>	<b>38,17 (4,20)</b>	<b>28,00-47,12</b>	<b>35,92 (4,11)</b>	<b>25,64-49,19</b>

En las Tablas 58-61 se muestran los valores de vitaminas y minerales aportados por los menús a base de puré y por los menús completos.

**Tabla 58.** Contenido de vitaminas (mg o  $\mu\text{g}$ ) de los menús de iniciación según el modelo de gestión.

Vitamina	Gestión directa (n=4)		Gestión contratada (n=4)	
	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx
Tiamina (mg)	0,24 (0,05)	0,20-0,32	0,26 (0,03)	0,24-0,30
Riboflavina (mg)	0,20 (0,03)	0,17-0,22	0,44 (0,05)	0,40-0,51
Niacina (mg)	4,38 (0,15)	4,20-4,50	7,63 (0,49)	7,00-8,10
Piridoxina (mg)	0,58 (0,07)	0,50-0,67	0,64 (0,09)	0,53-0,74
Cianocobalamina ( $\mu\text{g}$ )	0,19 (0,19)	0,00-0,42	0,88 (0,33)	0,43-1,20
Folatos ( $\mu\text{g}$ )	106,60 (23,60)	94,40-142,00	66,65 (0,78)	65,70-67,60
Ácido ascórbico (mg)	48,58 (0,48)	48,20-49,20	28,78 (0,55)	28,50-29,60
Vitamina A ( $\mu\text{g}$ )	100,35 (3,47)	97,70-105,00	820,50 (8,02)	815,00-832,00
Vitamina D ( $\mu\text{g}$ )	0,0048 (0,0095)	0,00-0,02	0,0863 (0,0225)	0,08-0,12
Vitamina E (mg)	1,35 (0,24)	1,20-1,70	1,15 (0,13)	1,00-1,30
Vitamina K ( $\mu\text{g}$ )	49,70 (18,15)	40,00-76,90	33,95 (2,10)	32,20-36,40
Ácido pantoténico (mg)	0,74 (0,18)	0,54-0,96	1,48 (0,25)	1,20-1,80
Biotina ( $\mu\text{g}$ )	15,68 (21,55)	4,80-48,00	7,04 (2,85)	8,70-9,60

**Tabla 59.** Contenido de vitaminas (mg o µg) de los menús completos según el modelo de gestión.

Vitamina	Gestión directa (n=226)		Gestión contratada (n=222)		p
	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	
Tiamina (mg)	0,32 (0,13)	0,12-0,86	0,34 (0,15)	0,14-0,78	0,166
Riboflavina (mg)	0,29 (0,07)	0,13-0,47	0,30 (0,08)	0,12-0,47	0,472
Niacina (mg)	8,64 (2,06)	4,50-13,40	8,48 (2,46)	4,36-16,97	0,445
Piridoxina (mg)	0,57 (0,21)	0,21-1,10	0,59 (0,21)	0,17-1,17	0,508
Cobalamina (µg)	0,77 (0,44)	0,00-1,84	0,82 (0,61)	0,00-2,73	0,272
Folatos (µg)	90,59 (33,93)	37,30-199,75	81,94 (45,81)	20,80-218,40	0,022
Ácido ascórbico (mg)	46,87 (20,79)	9,60-101,00	29,35 (18,98)	2,99-99,45	<0,001
Vitamina A (µg)	389,50 (280,38)	41,60-1618,0	335,65 (219,37)	37,12-994,50	0,024
Vitamina D (µg)	0,31 (0,42)	0,00-1,50	0,21 (0,28)	0,00-1,30	0,001
Vitamina E (mg)	2,21 (0,72)	0,03-4,40	1,59 (0,53)	0,65-2,99	<0,001
Vitamina K (µg)	62,06 (43,59)	7,70-249,00	43,37 (28,93)	9,95-130,00	<0,001
Ác pantoténico (mg)	1,27 (0,35)	0,62-2,30	1,23 (0,36)	0,49-2,41	0,204
Biotina (µg)	7,66 (5,33)	1,30-19,40	5,06 (2,95)	0,62-15,86	<0,001

p: Valor significativo

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido en vitaminas en función del tipo de gestión, con más aporte por parte de los menús completos de GD, de las siguientes vitaminas: folatos 8,76 µg (IC 95%: 1,24-16,27); ácido ascórbico 17,37 mg (IC 95%: 13,66-21,07); vitamina A 53,49 µg (IC 95%: 7,01-99,96); vitamina D 0,11 µg (IC 95%: 0,04-0,17); vitamina E 0,61 µg (IC 95%: 0,49-0,73); vitamina K 18,69 µg (IC 95%: 11,82-25,55) y biotina 2,59 µg (IC 95%: 1,80-3,39).

**Tabla 60.** Contenido de minerales (mg o µg) de los menús de iniciación según el modelo de gestión.

Mineral	Gestión directa (n=4)		Gestión contratada (n=4)	
	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx
Calcio (mg)	75,53 (8,54)	69,20-87,70	232 (6,73)	228,00-242,00
Hierro (mg)	2,63 (1,04)	1,80-4,10	2,15 (0,84)	1,60-3,40
Yodo (µg)	10,68 (3,04)	8,70-15,20	17,23 (7,11)	12,50-27,80
Magnesio (mg)	60,05 (16,87)	50,20-85,30	60,63 (3,22)	57,80-64,70
Zinc (mg)	1,2 (0,46)	0,75-1,60	2,25 (0,95)	1,50-3,60
Sodio (mg)	230,25 (11,03)	217,00-242,00	183,75 (21,73)	160,00-208,00
Potasio (mg)	769,25 (90,64)	701,00-902,00	1108 (59,77)	1051,0-1183,0
Fósforo (mg)	154,5 (42,15)	121,00-212,00	390,75 (45,28)	362,00-458,00
Selenio (µg)	8,1 (3,21)	5,30-12,60	17,05 (6,98)	9,50-26,40
Cobre (mg)	0,27 (0,10)	0,21-0,42	0,15 (0,02)	0,13-0,17
Cromo (µg)	16,15 (0,75)	15,60-17,20	4,93 (0,61)	4,50-5,80
Níquel (µg)	39,7 (45,53)	16,70-108,00	10,2 (0,80)	9,80-11,40
Cloro (mg)	405,5 (25,83)	380,00-441,00	351,75 (61,17)	296,00-439,00
Flúor (µg)	33,93 (4,12)	30,40-38,20	15,8 (7,40)	12,10-26,90
Manganeso (mg)	0,50 (0,23)	0,39-0,84	0,31 (0,00)	0,31-0,31

**Tabla 61.** Contenido de minerales (mg o µg) de los menús completos según el modelo de gestión.

Mineral	Gestión directa (n=226)		Gestión contratada (n=222)		p
	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	
Calcio (mg)	107,12 (32,68)	46,90-196,00	127,04 (58,43)	35,43-262,00	<0,001
Hierro (mg)	3,70 (0,90)	1,90-6,40	3,52 (0,99)	1,76-6,44	0,047
Yodo (µg)	21,49 (8,39)	9,10-40,00	20,01 (23,76)	7,74-172,25	0,380
Magnesio (mg)	74,67 (18,10)	43,60-121,00	72,13 (14,89)	35,56-111,15	0,105
Zinc (mg)	2,08 (0,69)	1,10-4,24	2,07 (0,59)	0,91-3,97	0,993
Sodio (mg)	805,79 (167,43)	390,00-1254,60	767,89 (307,76)	456,30-1891,5	0,107
Potasio (mg)	894,05 (264,69)	383,00-1540,00	895,50 (286,74)	317,85-1660,1	0,986
Fósforo (mg)	263,77 (51,30)	160,00-378,60	299,40 (75,66)	139,75-505,05	<0,001
Selenio (µg)	30,88 (13,38)	14,24-63,70	29,45 (14,40)	10,79-74,10	0,278
Cobre (mg)	0,33 (0,08)	0,24-0,59	0,34 (0,11)	0,12-0,65	0,591
Cromo (µg)	18,16 (14,24)	3,42-58,20	9,91 (7,64)	2,02-40,37	<0,001
Níquel (µg)	29,18 (22,33)	9,90-109,00	27,69 (31,02)	3,51-122,85	0,562
Cloro (mg)	1144,20 (241,89)	526,00-1589,00	867,26 (197,96)	484,25-1562,0	<0,001
Flúor (µg)	79,87 (33,200)	32,10-150,00	56,33 (25,32)	11,25-163,15	<0,001
Manganeso (mg)	0,86 (0,27)	0,44-1,70	0,67 (0,24)	0,27-1,50	<0,001

p: Valor significativo

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de los siguientes minerales, en función del tipo de gestión: calcio 19,79 mg más en GC (IC 95%: 10,90-28,56); fósforo 35,63 mg más en GC (IC 95%: 23,60-47,66); hierro 0,18 µg más en GD (IC 95%: 0,00-0,35); cromo 8,25 µg más en GD (IC 95%: 6,13-10,37); cloro 276,94 mg más en GD (IC 95%: 235,93-317,96); flúor 23,54 µg más en GD (IC 95%: 18,07-29,02) y manganeso 0,18 mg más en GD (IC 95%: 0,14-0,23).

El resultado de la evaluación de la calidad de los menús a través de varios indicadores, como el perfil calórico, el perfil lipídico y la calidad de la grasa se muestran en las Tablas 62 y 63 para los menús de iniciación y menús completos.

**Tabla 62.** Indicadores de la calidad de los menús de iniciación (perfil calórico, perfil lipídico y calidad de la grasa) según el modelo de gestión.

Indicador de calidad	Gestión directa (n=4)		Gestión contratada (n=4)	
	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx
Proteínas (%)	14,76 (1,34)	13,52-16,36	22,15 (1,91)	21,01-25,01
Glúcidos (%)	56,10 (4,85)	50,60-58,37	30,14 (2,19)	26,19-31,70
Azúcares simples (%)	30,85 (3,52)	25,99-34,34	15,45 (1,09)	14,29-16,87
Lípidos (%)	29,14 (4,94)	22,04-32,94	47,71 (1,67)	45,61-49,36
AGS (%)	6,38 (1,56)	4,29-7,81	12,31 (1,2)	11,02-13,49
AGMI (%)	16,49 (2,44)	12,86-18,00	26,26 (0,53)	25,68-26,89
AGPI (%)	3,94 (0,73)	3,37-4,98	5,25 (1,19)	3,89-6,27
AGPI $\omega$ -3 (%)	0,77 (0,21)	0,61-1,07	0,87 (0,33)	0,60-1,35
AGPI $\omega$ -6 (%)	3,13 (0,72)	2,66-4,21	4,18 (1,27)	3,06-5,38
AG <i>trans</i> (%)	0,18 (0,25)	0,00-0,52	1,02 (0,22)	0,81-1,32
Relación $\omega$ -6/ $\omega$ -3	4,25 (1,20)	2,62-5,50	5,28 (2,18)	2,27-7,31
AGPI/AGS	0,64 (0,14)	0,45-0,79	0,43 (0,10)	0,29-0,51
AGPI + AGMI/AGS	3,71 (0,36)	3,24-4,10	4,02 (0,49)	3,40-4,41

AGSI: Ácidos grasos insaturados. AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados. AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.  $\omega$ : omega. AG: Ácidos grasos. AGS: Ácidos grasos saturados.

**Tabla 63.** Indicadores de la calidad de los menús completos (perfil calórico, perfil lipídico y calidad de la grasa) según el modelo de gestión.

Indicador de calidad	Gestión directa (n=226)		Gestión contratada (n=222)		p
	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	$\bar{x}$ (DE)	Mín-Máx	
Proteínas (%)	14,50 (2,41)	7,02-19,01	17,55 (3,26)	8,31-26,83	<0,001
Glúcidos (%)	53,64 (7,14)	40,02-74,24	44,74 (6,89)	20,98-61,48	<0,001
Azúcares simples (%)	13,94 (3,94)	4,66-21,71	10,65 (2,75)	4,86-19,66	0,001
Lípidos (%)	31,88 (7,04)	15,20-47,71	37,68 (6,45)	23,70-54,82	<0,001
AGSI (%)	6,82 (2,30)	3,16-15,37	8,73 (2,58)	4,37-15,28	<0,001
AGMI (%)	17,29 (4,31)	6,47-28,19	20,72 (3,88)	12,89-32,89	<0,001
AGPI (%)	4,68 (1,14)	4,68-1,14	4,86 (1,00)	2,49-8,70	0,087
AGPI $\omega$ -3 (%)	0,73 (0,29)	0,17-1,56	0,68 (0,29)	0,28-1,89	0,066
AGPI $\omega$ -6 (%)	3,86 (1,05)	1,93-6,84	4,09 (0,97)	1,84-7,71	0,020
AG <i>trans</i> (%)	0,40 (0,59)	0,00-2,47	0,50 (0,53)	0,00-2,34	0,059
Relación $\omega$ -6/ $\omega$ -3	6,31 (3,06)	1,79-17,33	6,93 (2,78)	1,70-15,20	0,024
AGPI/AGS	0,74 (0,24)	0,35-1,44	0,60 (0,19)	2,49-8,70	<0,001
AGPI + AGMI/AGS	5,32 (0,83)	3,61-7,34	4,95 (0,84)	3,39-8,04	<0,001

AGSI: Ácidos grasos insaturados. AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados. AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.  $\omega$ : omega. AG: Ácidos grasos. AGS: Ácidos grasos saturados.

p: Valor significativo

En el perfil calórico encontramos diferencias estadísticamente significativas en las proteínas y lípidos con un 3,04% (IC 95%: 2,51-3,58) y un 5,87% (IC 95%: 4,62-7,12) superior en los menús completos de GC. Los glúcidos aportaron un 8,94% (IC 95%: 7,64-10,25) más de energía en los menús de GD, mostrando diferencias estadísticamente significativas. El aporte de azúcares simples también fue un 3,24% (IC 95%: 2,66-3,92) significativamente superior en los menús de GD que en los de GC.

En el perfil lipídico se encontraron diferencias significativas en los AGS y AGMI de los menús de GC, presentando un 1,91% (IC 95%: 1,45-2,36) y un 3,43% (IC 95%: 2,67-4,19) más que en los menús de GD. Igualmente, los menús de

GC presentaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de AGPI  $\omega$ -6 con un 0,22% más (IC 95%: 0,03-0,41), así como la relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 con una media de 0,63 superior a los menús de GC (IC 95%: 0,08-1,17). Respecto a los índices AGPI/AGS y AGPI + AGMI/AGS, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los menús de GD, con una media 0,14 (IC 95%: 0,10-0,19) y 0,38 (0,08-0,53) superiores, respectivamente, frente las medias de los menús de GC.

#### 4.2.2 Estudio de la composición y variedad de los menús completos

En la Tabla 64 se puede observar la media de la oferta de los diferentes grupos de alimentos obtenida tras la evaluación de los menús de los 11 meses del año 2017 y el porcentaje de ciclos de menús que cumplen las recomendaciones semanales del DoCACE (MSPSI, 2010), una vez extrapoladas a ciclos mensuales (20 días lectivos).

**Tabla 64.** Consumo por grupos de alimentos (número medio de raciones/mes) y porcentaje de ciclos de menús que cumplen las recomendaciones del DoCACE (MSPSI, 2010) según el modelo de gestión.

Grupos de alimentos	Gestión Directa		Gestión contratada		p
	$\bar{x}$ (DE) raciones/mes	%	$\bar{x}$ (DE) raciones/mes	%	
<b>Primeros platos</b>					
Arroz	3,64 (0,50)	63,63	1,45 (0,52)	0,00	<0,001
Pasta	4,18 (0,75)	72,82	7,36 (0,67)	0,00	<0,001
Legumbres	3,55 (0,82)	54,54	5,73 (1,10)	100,00	<0,001
Hortalizas (incluyendo patatas)	8,82 (1,08)	18,18	6,36 (0,50)	100,00	<0,001
<b>Segundos platos</b>					
Carnes	7,18 (1,40)	100,00	10,00 (0,89)	100,00	<0,001
Pescados	6,45 (1,04)	100,00	3,82 (0,60)	72,72	<0,001
Huevos	4,09 (0,54)	90,90	3,00 (0,63)	18,18	<0,001
<b>Precocinados</b>	0,90 (0,57)	100,00	1,18 (0,75)	100,00	0,226
<b>Guarniciones</b>					
Ensaladas	11,27 (3,17)	54,54	6,18 (0,87)	9,09	<0,001
Otras <sup>1</sup>	4,09 (1,14)	72,72	9,18 (1,33)	63,63	<0,001
<b>Postres</b>					
Frutas frescas	18,73 (1,56)	100,00	11,91 (0,54)	0,00	<0,001
Otros <sup>2</sup>	0,73 (0,79)	100,00	7,64 (0,67)	0,00	<0,001

<sup>1</sup> Patatas, hortalizas, legumbres, etc.

<sup>2</sup> Leche, yogur, queso fresco, cuajada, frutos secos, zumos naturales, etc.

Si se comparan los resultados obtenidos en función del tipo de gestión, se han hallado diferencias significativas en todos los grupos de alimentos excepto en los precocinados: GD 2,18 raciones más de arroz (IC 95%: 1,72-2,64);

GC 3,18 raciones más de pasta (IC 95%: 2,55-3,82); GC 2,18 raciones más de legumbres (IC 95%: 1,31-3,05); GD 2,46 raciones más de verduras y otras hortalizas (IC 95%: 1,68-3,22); GC 2,82 raciones más de carne (IC 95%: 1,77-3,88); GD 2,64 raciones más de pescado (IC 95%: 1,89-3,40); GD 1,09 raciones más de huevos (IC 95%: 0,57-1,61); GD 5,09 raciones más de ensaladas (IC 95%: 2,92-7,26); GC 5,09 raciones más de otras guarniciones (IC 95%: 3,99-6,20); GD 6,82 raciones más de fruta (IC 95%: 5,74-7,90); y GC 6,91 raciones más de otros postres (IC 95%: 6,26-7,56).

Respecto a la rotación mensual de alimentos dentro de un mismo grupo de alimentos, se cumplieron las recomendaciones para todos los grupos a excepción de los pescados (se incumplió en diez meses en la GD y en tres meses en los menús de GC).

La variedad de las recetas se cumplió en los menús de GC, mientras que en los menús de GD se cometieron incumplimientos en todos los meses menos en enero y julio en los grupos de alimentos que se muestran en la Tabla 65.

**Tabla 65.** Número de incumplimientos por repeticiones entre semanas de la misma receta en las cocinas de gestión directa.

Grupo de alimentos	N.º repeticiones de la misma receta entre semanas		
	1. <sup>a</sup> y 2. <sup>a</sup>	2. <sup>a</sup> y 3. <sup>a</sup>	3. <sup>a</sup> y 4. <sup>a</sup>
Legumbres, patatas, pasta y arroz	7	6	5
Carne y derivados	2	2	1
Pescado	3	2	4

Los procesos culinarios para los diferentes grupos se ajustaron a la variedad recomendada. Solo las verduras y otras hortalizas en el mes de marzo de los menús de GD y en mayo de los menús de GC no alcanzaron el número propuesto al cocinarse solo cremas, aparte de los productos frescos para ensalada.

## 4.3 DISCUSIÓN

### 4.3.1 Análisis cuantitativo de los menús: energía y nutrientes

Para el análisis cuantitativo de energía, nutrientes y otros indicadores de calidad de los menús nos hemos apoyado en un programa informático nutricional. Existe una gran variabilidad entre las TCA utilizadas en estudios de investigación, así como en el desarrollo de programas informáticos dietéticos, tal como destacó Lupiañez-Barbero *et al.* (2018). Esto propicia resultados sesgados y no comparables. Estos autores recogen algunas limitaciones de las TCA nacionales: variabilidad en la composición química del alimento; diferentes mé-

todos de análisis utilizados; variación en la porción comestible; diferencias en el cálculo del valor energético; diferencias según el proceso culinario utilizado; nomenclatura del alimento (nombre común) que difiere según zonas geográficas. Las razones por las que se eligió el programa DIAL® para el análisis de nuestros datos fueron que está diseñado por un grupo de nutricionistas españoles de gran prestigio (Ortega *et al.*, 2016), y porque es el programa utilizado por las empresas encargadas de elaborar los menús de GD y GC en los CEI del Ministerio de Defensa.

Otro asunto de controversia, son las recomendaciones utilizadas para la ingesta de energía de los menús servidos en centros escolares. En nuestro estudio, nos hemos decantado por las recomendaciones nutricionales publicadas en el libro de las Tablas de Composición de Alimentos (Moreiras *et al.*, 2018), por su amplia cobertura y revisión de las necesidades de la población española, como lo avalan las 19 ediciones del manual. La ingesta de energía recomendada para los niños de 7 a 12 meses y de 1 a 3 años de edad es de 950 kcal/día y 1250 kcal/día, respectivamente. Estas necesidades son para una actividad moderada, aumentando un 20% para una actividad alta y reduciéndose un 10% para una actividad ligera.

La comida del mediodía ofrecida en el comedor escolar debe aportar alrededor de un 35% de la energía total de las necesidades diarias (MISACO, 2008). Considerando este aporte y las recomendaciones para una actividad física moderada, la contribución de la comida escolar a las necesidades energéticas diarias debería ser de 332,5 kcal en los menús de iniciación y de 437,5 kcal en los menús completos. Si se tienen en cuenta los requerimientos para una actividad alta y ligera los límites se establecerían entre 399 kcal y 299,25 kcal para los menús de iniciación y entre 525 kcal y 393,75 kcal para los menús completos.

Los menús de iniciación a base de puré servidos en los comedores de los CEI con cocina propia (GD), con un aporte medio de 247,50 kcal, no alcanzaron el mínimo recomendado por Moreiras *et al.* (2018). Sin embargo, el aporte de los menús servidos por la empresa subcontratada de *catering* (GC) fue correcto, con una media de 322,25 kcal. Por tanto, el aporte energético de los menús de GC fue adecuado (33,92%), mientras que el aporte deficitario de los menús de GD (26,05%) provoca un desequilibrio que debe ser compensado con el resto de las comidas del día.

En el caso de los menús completos elaborados en las cocinas de GD, con un aporte medio de 476,72 kcal, y los servidos en los comedores de GC, con un aporte de 448,98 kcal, satisficieron los requerimientos energéticos con una contribución del 38,17% y 35,92% de la energía total diaria, respectivamente.

A pesar de que algunos menús completos no alcanzaron los límites propuestos (el 6,64% de los menús en GD y el 9% en GC) y otros los sobrepasaron (el 18,58% en GD y el 9% en GC), la media de cada uno de los meses evaluados cumplieron las recomendaciones energéticas, como se puede observar en la Tabla 57.

En el estudio llevado a cabo por Seiquer *et al.* (2016) en CEI de Granada, se estimó una ingesta media de 512,49 kcal/día, lo que supone un 30,15% de las recomendaciones en las que se basaron (1700 kcal/día para niños de 4-6 años de edad). En otro estudio en Andalucía, esta vez en CEI de Sevilla por Vergara *et al.* (2016), los menús aportaron un 30,6% de energía respecto a las recomendaciones de referencia (1300-2000 kcal/día para niños de 1-3 años de edad).

A nivel de centros escolares para niños de más edad se dispone de más datos y muestran unos valores energéticos similares a nuestro estudio, entre un 35 y 38% (Del Pozo *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010). Estos autores justificaron el contenido ligeramente elevado de energía por la alta contribución de proteínas y de lípidos en detrimento de los hidratos de carbono. En un estudio más reciente realizado por Castro *et al.* (2016) en colegios públicos, privados y concertados de Sevilla, compararon la energía aportada por los menús con las necesidades establecidas en el Programa PERSEO para los diferentes grupos de edad. El aporte energético solo resultó adecuado para el grupo de edad comprendido entre 6 y 9 años, siendo excesivo o deficitario para el resto de grupos. Esto pone de manifiesto que, para que el menú proporcione la energía adecuada a un grupo determinado, se debe tener en cuenta el tamaño de la ración. Sirva de ejemplo en nuestro estudio, el ajuste del 60-70% que realiza la empresa de GC sobre sus menús completos de edad escolar para adaptarlos a edad preescolar.

Ambos tipos de menús presentaron una cantidad elevada de **proteína** en ambas modalidades de gestión (menús de iniciación: GD, 9,18 g y GC, 17,90 g; y menús completos: GD, 18,35 g y GC, 19,61 g), si los comparamos con las ingestas diarias recomendadas por Moreiras *et al.* (2018) de 20 g y 23 g para niños de 7 a 12 meses y 1 a 3 años de edad, respectivamente, y teniendo en cuenta que los niños consumirán 3 ó 4 comidas más a lo largo del día.

Respecto a la distribución energética de los macronutrientes en la comida principal del día, se recomienda que el contenido de proteína contribuya con un 12-15% al aporte calórico total (MISACO, 2008). En los menús de iniciación de GD se ajustó perfectamente (14,76%), pero en GC se alcanzó un valor del 22,15%. Con los menús completos la situación fue la misma, un 14,50% en los menús de GD y un ligero exceso en los menús de GC (17,55%).

El exceso proteico de nuestro estudio está en consonancia con lo encontrado en los dos estudios previos llevados a cabo en CEI españoles. Tanto Seiquer *et al.* (2016) como Vergara *et al.* (2016), obtuvieron una contribución elevada de proteínas (más del 17%). Valores similares, incluso superiores, se encontraron en las evaluaciones realizadas en colegios de Madrid (Del Pozo *et al.*, 2006; Berradre-Sáenz *et al.*, 2015), Tenerife (Campos *et al.*, 2008), Granada (Martínez *et al.*, 2010), Vizcaya (Zulueta *et al.*, 2011), Valencia (Micó *et al.*, 2013) y Sevilla (Castro *et al.*, 2016). El motivo lo relacionaron con el consumo excesivo de alimentos de origen animal (carne magra principalmente, pescado blanco y huevos), que es el patrón que viene observándose en los últimos años en los países industrializados.

La excesiva ingesta de proteínas está relacionada con un mayor riesgo de obesidad y, por tanto, de ENT, por lo que a tenor de nuestros resultados y de otros trabajos, se debe intentar reducir el consumo de alimentos proteicos.

La ingesta media de **glúcidos** en los menús de iniciación fue de 31,63 g en los comedores de GD y de 22,20 g en los de GC. En los menús completos se encontraron diferencias significativas según el tipo de gestión, con un valor medio de 56,11 g en GD y 46,66 g en GC.

No existen IR para hidratos de carbono, sino objetivos nutricionales que aconsejan que el 50-60% de la energía total provenga de los glúcidos (MISACO, 2008). Esta recomendación la cumplieron los menús de iniciación de GD (56,10%), pero la contribución energética de los hidratos de carbono en los menús de GC fue muy inferior a la deseada (30,14%). Además, en ambos casos se superaron los objetivos nutricionales para los azúcares sencillos, que deben aportar menos del 10% a la energía total diaria (Ortega *et al.*, 2014b, OMS, 2015; Moreiras *et al.*, 2018), con unos valores del 30,85% y 15,45% en GD y GC, respectivamente.

En el caso de los menús completos ocurrió lo mismo, el aporte de hidratos de carbono en GD fue satisfactorio (53,64%) y en GC no alcanzó el 50% (44,74%). Los azúcares sencillos superaron lo marcado en los objetivos nutricionales con 13,94% en GD y 10,65% en GC.

Si comparamos nuestros resultados en GD con los obtenidos en otros CEI, vemos que son similares a los reportados por Vergara *et al.* (2016), que hallaron aportes de entre el 50 y el 60% de lo recomendado, y por Seiquer *et al.* (2016) con un 52%. En colegios, Campos *et al.* (2008) y Micó *et al.* (2013), también indicaron un aporte correcto de hidratos de carbono (54%). Sin embargo, otros estudios en colegios coincidieron con lo encontrado en nuestros menús de GC, con un aporte deficiente en hidratos de carbono (Del Pozo *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2010; Zulueta *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2016).

La OMS ya señaló, a principios de siglo, la importancia de un alto consumo de hidratos de carbono complejos puesto que son la principal fuente de energía de la dieta. Alimentos como los cereales (pan, pasta, arroz), patatas, fruta y verduras aportan estos macronutrientes, además de micronutrientes y fibra, y constituyen una ventaja frente a los azúcares sencillos al evitar la cariogénesis infantil, la obesidad y también prevenir las enfermedades crónicas en el adulto (OMS, 2003).

En cuanto a la **fibra**, el aporte fue de 6,88 g y 4,10 g en los menús de iniciación de GD y GC, respectivamente. Para los menús completos de GD el valor medio fue de 7,83 g y de 7,04 g en GC.

La ingesta recomendada de fibra se establece de acuerdo a la siguiente fórmula: “edad en años + 5 g/día” con el límite máximo de “edad en años + 10” g/día”. Para menores de 3 años se admite una introducción progresiva de 5 g/día con la alimentación complementaria, hasta un máximo de 10 g/día a los 3

años (Williams, 1995). Nuestros resultados, considerando que se refieren solo a una de las comidas del día se consideran elevados. Hay que tener en cuenta que ingestas muy elevadas de fibra pueden tener un efecto adverso en la absorción de algunas vitaminas y minerales, si bien se puede ver compensado por los beneficios que proporcionan en cuanto al control del peso, colesterol, glucemia, etc.

En los dos estudios previos en CEI obtuvieron un aporte de fibra cercano a los 8 g/día (Seiquer *et al.*, 2016; Vergara *et al.*, 2016), similares a los constatados en menús escolares (Campos *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010).

Se observó que los menús de iniciación aportaban una ingesta media de **lípidos** de 7,90 g en GD y de 17,10 g en GC. Para los menús completos de GD la ingesta media fue de 17,91 g y para los de GC se obtuvo una media de 18,90 g ingeridos.

No se señalan IR de grasas, pero se aconseja que el aporte a la energía total no sobrepase el 30-35% (MISACO, 2008). Al referir la ingesta de grasa al aporte energético de la dieta, la grasa supuso un 29,14% en los menús de iniciación de GD, mientras que en los de GC se superó holgadamente lo recomendado, con un 47,71%. Respecto a los menús completos, los de GD se ajustaron correctamente a las recomendaciones con un 31,88% y los de GC las sobrepasaron al aportar un 37,68%.

En los menús de los CEI de Sevilla, las grasas totales se encontraron por debajo de las recomendaciones (Vergara *et al.*, 2016). Por el contrario, los menús de los CEI de Granada casi alcanzaron un 34% de grasas (Seiquer *et al.*, 2016). En los estudios llevados a cabo en colegios hay resultados por debajo de las recomendaciones (Campos *et al.*, 2008), que cumplen las recomendaciones (Zulueta *et al.*, 2011) y otros que superan lo aconsejado (Del Pozo *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2010), incluso con valores de alrededor del 50% en la mitad de los menús estudiados (Castro *et al.*, 2016).

Los valores medios de ingesta de **colesterol** en los menús de iniciación fueron de 17,80 mg en GD y de 53,98 mg en GC. En los menús completos se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la ingesta de colesterol en función de la modalidad de gestión, con 90,34 mg en GD y 59,27 mg en GC. Si comparamos estos valores con los objetivos nutricionales de no superar los 300 mg/día o, preferiblemente, con el criterio más adecuado para niños de no superar la ingesta de colesterol de 100 mg/1000 kcal, solo cumplieron lo aconsejado los menús de iniciación de GD.

Estos resultados están en consonancia con el contenido medio hallado en los menús de CEI de Granada que superó, en algo más de un 20%, los valores aconsejados (Seiquer *et al.*, 2016), y con los encontrados en colegios (179 mg/1000 kcal) por Martínez *et al.* (2010). Sin embargo, Vergara *et al.* (2016) observaron un aporte adecuado de colesterol en todos los menús evaluados en los CEI de Sevilla, al igual que Campos *et al.* (2008) en colegios de Tenerife.

Los niveles elevados de colesterol de nuestro estudio se asocian con los niveles altos de grasas en los menús de GC. Por tanto, en la medida prioritaria de reducir el aporte de grasas, habría que valorar también la restricción dietética del colesterol, cuya ingesta elevada, pese a sus importantes funciones biológicas para el organismo, podría afectar negativamente a la salud cardiovascular del niño.

Respecto a los **indicadores de calidad**, ya se ha dicho anteriormente que el **perfil calórico** de los menús de iniciación y completos de GD se ajustaron a los objetivos nutricionales establecidos. Sin embargo, los menús de iniciación y completos de GC estuvieron desequilibrados con un excesivo consumo de grasas y proteínas e insuficiente aporte de hidratos de carbono, en línea con lo indicado en otros estudios en centros educativos (Del Pozo *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010).

Este patrón es típico en nuestro país y ya se puso de manifiesto por Lambert *et al.* (2004) en un estudio sobre la alimentación de niños y adolescentes europeos, indicando la menor ingesta de hidratos de carbono en los países mediterráneos y resultando España y Grecia los países con ingesta de grasa más elevada. El reciente Estudio Nutricional en Población Infantil Española (EsNuPI) en niños entre 1 y 10 años, confirma este patrón dietético (proteínas 16,5%, carbohidratos 45,4% y grasas 36,5%) (Madrugal *et al.*, 2020), en consonancia con otros estudios previos en niños y adolescentes españoles (ALSALMA de Dalmau *et al.*, 2015; ANIBES de Pérez-Rodrigo *et al.*, 2016 y ENALIA de López-Sobaler *et al.*, 2017).

En el caso de los menús de iniciación de GC, donde el desequilibrio es más llamativo, el elevado aporte energético de los lípidos, con un 47,71%, unido al alto porcentaje proteico (22,15%), se relaciona con el bajo aporte de los hidratos de carbono mencionado anteriormente (30,14%). Una posible explicación es el postre diario a base de yogures ofrecido en GD, en detrimento del puré de frutas, fuente de hidratos de carbono. No hay que olvidar que los postres lácteos deben ser un complemento, pero no sustituir a la fruta. Para los menús completos de GC el reajuste también sería deseable, disminuyendo el consumo de carne y aumentando el consumo de pescados, huevos y alimentos de origen vegetal (ensaladas y frutas).

Un **perfil lipídico** equilibrado es beneficioso para prevenir las enfermedades cardiovasculares por el papel protector que desempeñan las grasas insaturadas y la asociación entre la excesiva ingesta de AGS y niveles altos de colesterol LDL plasmático. Por tanto, además de la cantidad de grasa total ingerida es importante conocer el tipo de AG ingeridos. El porcentaje de AGS se aproximó a los objetivos nutricionales del 7-8% en los menús completos (GD: 6,82% y GC: 8,73%) y en el menú de iniciación de GD (6,38%). Los menús a base de purés de GC presentaron una cantidad excesiva de AGS (12,31%). El porcentaje de energía total aportada por los AGPI también se aproximó en líneas generales a los objetivos nutricionales del 5%, con una presencia de 3,94% y 5,25% en los menús de iniciación de GD y GC, respectivamente, y del 4,68% y 4,86% en los menús completos de GD y GC. El objetivo nutricional del 20% de AGMI en los

menús de GD no se alcanzó (iniciación: 16,49% y completo: 17,29%), aunque cumpliría el propuesto por Ortega *et al.* (2014b) del 15-20%. Este objetivo fue superado en los menús de GC (ampliamente en los de iniciación: 26,26% y ligeramente en los menús completos: 20,72%), lo que podría deberse a un mayor uso del aceite de oliva en las recetas, habitual en nuestra dieta.

En el estudio de los CEI de Sevilla se presentaron valores deficitarios en las grasas insaturadas (AGMI y AGPI) y adecuados en las grasas saturadas (Vergara *et al.*, 2016), que concuerdan con los resultados en menús de colegios (Del Pozo *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2008). Por el contrario, los menús de los CEI de Granada presentaron una correcta proporción de los AG respecto a la energía total (Seiquer *et al.*, 2016).

Conocer la ingesta media de grasa y el perfil lipídico es relevante, pero también es importante considerar aspectos de la **calidad de la grasa**.

Así, los objetivos nutricionales para el aporte energético a partir de AG *trans* indican que tienen que ser inferior al 1%. Así ha ocurrido en los menús completos de GD 0,40% y GC 0,50% y en los menús de iniciación de GD con un 0,18%. En el caso de los menús de iniciación de GC el aporte de AG *trans* se ha ajustado a lo aconsejado (1,02%).

La ingesta media de AGPI  $\omega$ -3 fue inferior a la recomendación del 1-2% de la energía total en todos los menús de ambas gestiones: menú de iniciación GD 0,77% y GC 0,87%; menú completo GD 0,73% y GC 0,68%. Los valores de AGPI  $\omega$ -6 fueron 3,13% en los menús de iniciación de GD y 4,18% en los de GC y para los menús completos de GD y GC del 3,86% y 4,09%, respectivamente. Los valores hallados están alrededor del 3% recomendado por Serra y Aranceta (2011) y Moreiras *et al.* (2018) y dentro de los objetivos nutricionales si consideramos el 2-6% propuesto por Ortega *et al.* (2014b).

Los países de altos ingresos suelen tener una dieta que contiene un alto contenido en AGPI  $\omega$ -6, en detrimento de la ingesta de  $\omega$ -3, por lo que la razón entre  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 normalmente excede la relación aconsejada (<4:1), como ocurre en nuestro estudio (menús de iniciación GD 4,25 y GC 5,28; menús completos GD 6,31 y GC 6,93).

Otras dos relaciones empleadas para la valoración de la calidad de la grasa son AGPI/AGS y (AGPI + AGMI)/AGS. Para la primera razón el objetivo nutricional establece que este índice deber ser  $\geq 0,5$ , siendo incumplido en los menús de iniciación de GC (0,43). El resto sí lo satisface, con un 0,64 en los menús de iniciación de GD y en los menús completos de GD y GC con un 0,74 y 0,60, respectivamente. La recomendación del índice (AGPI + AGMI)/AGS refiere que tiene que ser  $\geq 2$  y se cumplió tanto en los menús de iniciación como en los completos en ambos tipos de gestión.

En el estudio de los menús ofertados en las guarderías de Granada obtuvieron resultados similares en ambos índices: AGPI/AGS 0,8 y (AGPI + AGMI)/AGS  $\geq 2$  (Seiquer *et al.*, 2016).

Con todo lo señalado anteriormente, es importante tener en cuenta un buen aporte de AG esenciales así como  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 importantes en el desarrollo del niño y su salud futura.

La mayor parte de las ingestas medias de las **vitaminas** recogidas en la Tabla 58 y 59 fueron adecuadas, e incluso algunas superaron las IR diarias de Moreira *et al.* (2018). Fue el caso de la piridoxina, el ácido fólico y la vitamina K en ambas modalidades de los menús de iniciación y, además, en los de GC también excedieron las IR diarias la niacina, la cianocobalamina y la vitamina A. En los menús completos superaron las IR diarias la niacina, la vitamina A y la vitamina K en ambas modalidades de gestión. Los contenidos de vitamina D fueron muy bajos en los dos menús de ambos tipos de gestión (menús de iniciación: GD 0,05%; GC 0,86% y menús completos: GD 2,07%; GC 1,4%, de las IR diarias). Otras vitaminas que han presentado valores bajos, dentro de nuestros resultados, han sido la vitamina E en los menús de iniciación de ambas modalidades de gestión (GD 22,50%; GC 19,17% de las IR diarias) y en los completos de GC (26,5% de la IR diaria) y la vitamina A en los menús de iniciación de GD (22,30% de la IR diaria).

Nuestros resultados coinciden con los realizados en otros CEI españoles que también obtuvieron, en general, un contenido de vitaminas adecuado en los menús ofertados (Seiquer *et al.*, 2016, Vergara *et al.*, 2016). Es más, en el caso de los CEI granadinos (Seiquer *et al.*, 2016) algunas vitaminas (ácido fólico, vitamina A y C) superaron las IR, que a su vez concuerda con los resultados de las comidas analizadas en otros centros escolares (Del Pozo *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Zulueta *et al.*, 2011). Contrariamente a nuestro estudio y a los citados anteriormente, en los CEI sevillanos la vitamina D superó las IR. Por el contrario, encontraron cantidades muy inferiores a las recomendadas de vitamina C y E (Vergara *et al.*, 2016).

En el estudio EsNuPI también se ha obtenido una preocupante ingesta de vitamina D (Cuadrado-Soto *et al.*, 2020). La vitamina D es importante para la prevención de la osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y cáncer. La baja oferta de pescado azul puede que haya contribuido al bajo contenido en vitamina D de los menús. Esta carencia se puede compensar con el resto de comidas diarias y con otras fuentes de vitamina D como los productos lácteos (2 raciones/día) y la yema de huevo, o incluso fórmulas enriquecidas. Además, existe la posibilidad de una síntesis endógena de esta vitamina por exposición a la luz solar.

En cuanto a las ingestas medias de los **minerales**, en general, se han ajustado a las IR diarias para los niños de edad preescolar de Moreira *et al.* (2018), aunque algunos de estos micronutrientes superaron estas recomendaciones. Este exceso se presentó en el potasio de los dos menús de ambas modalidades, en el fósforo del menú de iniciación de GC, en el selenio del menú de iniciación de GC y del menú completo de ambas modalidades y en el sodio del menú completo de ambas modalidades. Por otro lado, en nuestra escala de resultados, los minerales que han presentado los niveles más bajos de IR

diarias han sido el calcio (14,39%), el zinc (24,00%) y el yodo (23,73%) de los menús de iniciación de GD y el calcio (GD 17,85%; GC 21,17%) y el zinc (GD: 20,80%; GC: 20,70%) de los menús completos de ambas modalidades.

Nuestros resultados son consonantes con los publicados en otros CEI. Vergara *et al.* (2016) hallaron un alto aporte de potasio y selenio y bajo de calcio. Seiquer *et al.* (2016) declararon niveles de calcio del 16% de la IR diaria y del 21% en zinc. En colegios, Campos *et al.*, (2008), encontraron niveles deficientes en el yodo, zinc y hierro, mientras que Del Pozo *et al.* observaron que todos los minerales evaluados (calcio, hierro, magnesio y zinc), aportaron más del 35% de las IR diarias.

La deficiencia de zinc se ha relacionado con déficit de crecimiento y alteraciones del gusto y del olfato, por lo que hay que promover el consumo de las principales fuentes de este mineral (carnes, pescados, legumbres, lácteos y cereales) y complementar su consumo en otras comidas del día, lo que ayudaría a aproximar la ingesta de este micronutriente, esencial en la síntesis de hormonas tiroideas y en la capacidad cognitiva del menor, a la recomendada.

Los niveles bajos de calcio pueden tener su explicación en que el mayor aporte se proporciona en los productos lácteos consumidos en otras comidas del día (desayuno, merienda). Esta justificación se ve reforzada con el valor medio más alto de calcio de 232 mg de los menús de iniciación de GC que todos los días ofrecían yogur de postre. En cualquier caso, las IR diarias para el calcio, equivalentes a 2 raciones de lácteos/día, se pueden compensar con el desayuno o merienda y asegurar el nivel adecuado de este mineral indispensable para la óptima formación de la masa ósea y crecimiento del esqueleto del niño.

En relación con la osificación también hay que tener en cuenta la ingesta del fósforo ya que se recomienda una razón Ca/P entre 1:1 y 2:1 en la dieta, porque asegura un aprovechamiento máximo del calcio (Ortega *et al.*, 2014b). En ninguno de los menús estudiados se alcanzó esa relación (menús de iniciación GD 0,51; GC 0,60 y menús completos GD 0,40; GC 0,41), debido al bajo contenido en calcio y al elevado en fósforo (como consecuencia de la oferta de menús con alto contenido en proteína), a similitud de otros dos estudios en guarderías (Seiquer *et al.*, 2016; Vergara *et al.*, 2016) y en población infantil (Cuadrado-Soto *et al.*, 2020). Este hecho puede afectar desfavorablemente a la formación y desarrollo óseo en edad preescolar y suponer riesgo de osteoporosis en el futuro.

Tanto en los dos estudios citados en CEI de Andalucía como en nuestro estudio se obtuvieron valores adecuados de hierro cuyas necesidades son elevadas en fases de gran crecimiento y su ingesta suele asegurarse con el consumo de raciones de carne.

Por otro lado, referente a la ingesta de sal, las recomendaciones de la AEP son 0,8 g/día de sodio para los niños de 1 a 3 años y menos de 0,4 g/día de sodio hasta los 12 meses (Gómez *et al.*, 2018). La ingesta media de sodio fue

adecuada en los menús de iniciación con 230,25 mg en GD y 183,75 mg en GC, por lo que habría que controlar su consumo en el resto de comidas para no superar el límite recomendado. En los menús completos los resultados de GD excedieron la recomendación diaria con una cantidad media de 805,79 mg y prácticamente alcanzaron la IR diaria en GC con una ingesta 767,89 mg. La cantidad excesiva de sodio puede proceder del consumo elevado de precocinados, patatas fritas, carnes y derivados, pescados y derivados, pero en nuestro ámbito de estudio hay que valorar la sal discrecional (sal añadida durante el cocinado y, en menor medida, en la mesa).

Otro índice nutricional para determinar la calidad de la dieta es la relación sodio/potasio que debe ser próxima a 1 (OMS, 2003). En los menús completos hemos descrito unos valores altos de sodio, pero también hemos señalado que la ingesta de potasio fue elevada, por lo que este índice se ajusta a las recomendaciones debido a la excesiva ingesta de ambos minerales (GD 0,99 y GC 0,95). Sin embargo, en los menús de iniciación donde la ingesta de sodio fue correcta y la de potasio excesiva, el índice presenta unos valores bajos (GD 0,30 y GC 0,17).

En el estudio de la planificación del menú escolar de Morán *et al.* (2013), el control aleatorio de porciones duplicadas del menú para el análisis bromatológico, permitió identificar que el aporte energético y el porcentaje de proteínas y grasas sobre el valor calórico total eran elevados. Esta experiencia puso de manifiesto que la exclusiva información de la planilla del menú no proporciona la totalidad de la información nutricional.

Por tanto, una posible limitación de nuestro estudio podría ser que para la evaluación cuantitativa de los menús ofertados se han utilizado datos secundarios (programación mensual de los menús). En este sentido, Martínez *et al.* (2010), realizaron la evaluación mediante fotografías estandarizadas con distintos tamaños de ración y midiendo volúmenes de los utensilios en el servicio de las comidas. Zulueta *et al.* (2011) determinaron la ingesta real cuantitativa total y cualitativa mediante la técnica de doble pesada de alimentos y la estimación visual de los residuos (método de Comstock). Estos autores concluyeron que la estimación de la ingesta nutricional es siempre un método impreciso, siendo la técnica de doble pesada más precisa que la técnica de Comstock, que sirve de complemento de la primera, aunque de un modo más subjetivo. En el estudio de Campos *et al.* (2008), registraron los alimentos por el método de doble pesada, pero finalmente acabaron evaluando sobre la ración servida, porque les fue imposible llevar a cabo la valoración por el escaso número de cuidadores en los comedores.

En nuestro estudio no hemos realizado un análisis bromatológico, ni hemos evaluado la calidad nutricional de la dieta a través de la cantidad real servida en los platos en los comedores de los CEI ni del consumo de los escolares, pero la información recabada a partir de las planillas de los menús, fichas técnicas y conversaciones con las empresas de GD y GC, la consideramos una fuente de información regular y que permite una aproximación bastante fidedigna.

### 4.3.2 Estudio de la composición y variedad de los menús completos

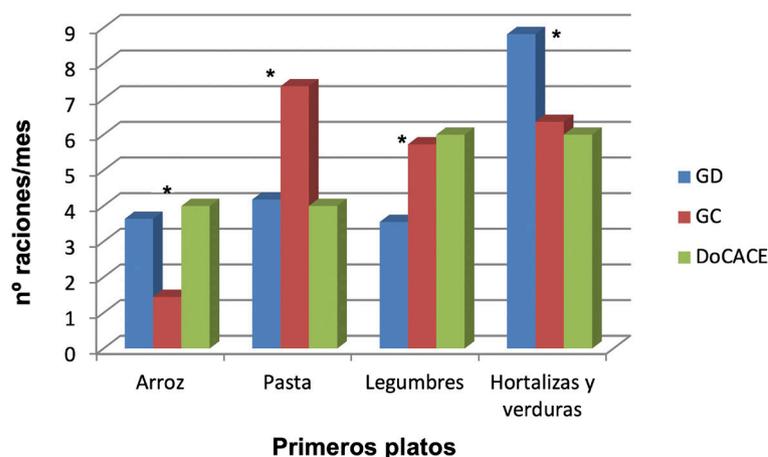
#### 4.3.2.1 Frecuencia de oferta de los diferentes grupos de alimentos

Los **cereales y derivados** (arroz, pasta y pan) deben constituir la base de la alimentación infantil en los menús de centros educativos. En ambas modalidades de servicio se presentó una ración diaria de pan. En GD más del 70% de los ciclos cumplieron las recomendaciones de 4 raciones mensuales en cuanto a la oferta de pasta con una media de 4,18 raciones/mes. Además, un porcentaje superior al 60% alcanzó la frecuencia recomendada de 4 raciones para el arroz con una media total de 3,64 raciones/mes. Sin embargo, en GC los platos con arroz se quedaron muy por debajo de las 4 raciones deseadas (1,45 raciones/mes), sin que se cumplieran las recomendaciones en ningún ciclo de menús. Este déficit se podría resolver disminuyendo el alto número de platos de pasta que se sirvieron (7,36 raciones/mes), que excedieron las recomendaciones en todos los ciclos.

Hay que destacar que en la última pirámide de la alimentación saludable se hace hincapié en la importancia de dar a los niños alimentos a base de cereales integrales (pan, pasta, arroz), porque son más ricos en fibra, vitaminas y minerales que los refinados (Aranceta-Bartrina, 2019).

El otro bloque de primeros platos lo constituyen las **verduras y otras hortalizas** (incluidas las patatas) y las **legumbres**. Se recomienda que sean consumidas entre 4-8 veces al mes. En este caso, el 100% de los ciclos de menús de GC cumplieron con estos requisitos con una media de 5,73 raciones mensuales para verduras y otras hortalizas y de 6,36 raciones para legumbres. Mientras tanto, en los menús de GD, el 72% de los ciclos sobrepasaron las recomendaciones de verduras y otras hortalizas representado con una oferta media de 8,82 veces al mes y las legumbres presentaron un ligero déficit (3,55 raciones/mes) observándose las recomendaciones en el 55% de los ciclos.

La Figura 17 representa el número de raciones ofertadas de todos los primeros platos evaluados en función de la modalidad de gestión y comparadas con



\*Diferencias significativas ( $<0,001$ )

**Figura 17.** Número de raciones ofertadas de primeros platos según el modelo de gestión

las frecuencias semanales recomendadas por el DoCACE (MSPSI, 2010), una vez que se han extrapolado a un ciclo semanal (20 días lectivos).

Es recomendable que las hortalizas, verduras y tubérculos se consuman diariamente, ya sea cocinadas en los primeros platos o crudas como en las ensaladas, que es la mejor manera de aprovechar sus minerales. Por ello, se aconseja que se sirvan entre 12-16 ensaladas variadas al mes acompañando a los segundos platos. Las **guarniciones** de ensalada en GD casi alcanzaron este objetivo (11,27 raciones/mes) al ser cumplido en más de la mitad de los ciclos de menús, mientras que en GC no se acercaron al valor deseado con 6,18 raciones de media y solo un ciclo de menús cumplió la frecuencia aconsejada.

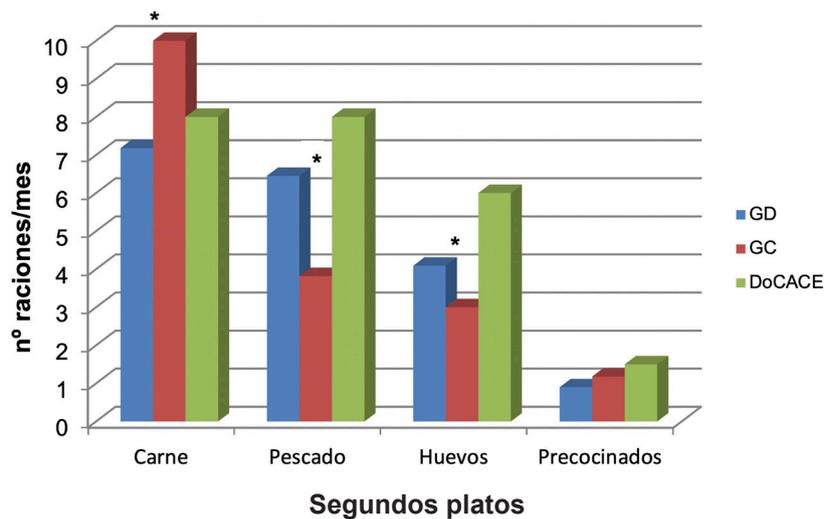
Por el contrario, en GC otro tipo de guarniciones (patatas, hortalizas, legumbres, etc.) se presentaron con mayor frecuencia (9,18 raciones/mes) que la recomendada (4-8 raciones/mes), al ser excedida en el 64% de los ciclos. El 73% de los ciclos de GD cumplieron con los valores de referencia con una media mensual de 4,09 raciones. Es de destacar, que la presencia de patatas fue baja y que la fritura fue sustituida por otras formas de cocinado (cocidas, al vapor), evitando el abuso de patatas fritas y el consiguiente elevado aporte de sal que se ha reportado en el estudio ENALIA (López-Sobaler *et al.*, 2017).

Respecto a los **segundos platos**, principal fuente proteica, las **carnes y pescados** se recomiendan consumir 4-12 veces y los **huevos** 4-8 raciones al mes. En GD se cumplieron estos requisitos para las carnes y pescados en los 11 ciclos de menús y para los huevos en todos menos en febrero con una media de 7,18, 6,45 y 4,09 raciones, respectivamente. Sin embargo, en GC solo cumplieron el 18% de los ciclos las frecuencias establecidas para los huevos con una media de 3 raciones y para los pescados el 70% con un consumo de 3,82 raciones al mes. Estas carencias se podrían solventar aumentando la oferta de estos dos segundos platos en detrimento del consumo de carne que presentó una media de 10 veces al mes, cercana al límite superior recomendado. Además, esta reducción del consumo de carne ayudaría a ajustar otros desequilibrios mencionados en macronutrientes y micronutrientes, como el excesivo aporte proteico, lipídico, de colesterol o sodio.

Es importante recordar que el DoCACE (MSPSI, 2010), recomienda incluir las preparaciones cárnicas con mayor contenido graso (salchichas, hamburguesas, albóndigas, etc.) con una frecuencia máxima de una vez por semana, evitando que estén acompañadas de guarniciones fritas. Este aspecto se ha cumplido normalmente en ambas modalidades.

El DoCACE (2010) aconseja limitar el uso de productos **precocinados** (canelones, pizzas, croquetas, empanadillas, rebozados y empanados, etc.) a una frecuencia máxima de tres veces al mes, evitando de nuevo, que las guarniciones de acompañamiento sean frituras. Tanto GD como GC, cumplieron con esta premisa (0,90 y 1,18 raciones/mes, respectivamente).

La Figura 18 representa el número de raciones ofertadas de todos los segundos platos evaluados en función de la modalidad de gestión y compara-



\*Diferencias significativas ( $<0,001$ )

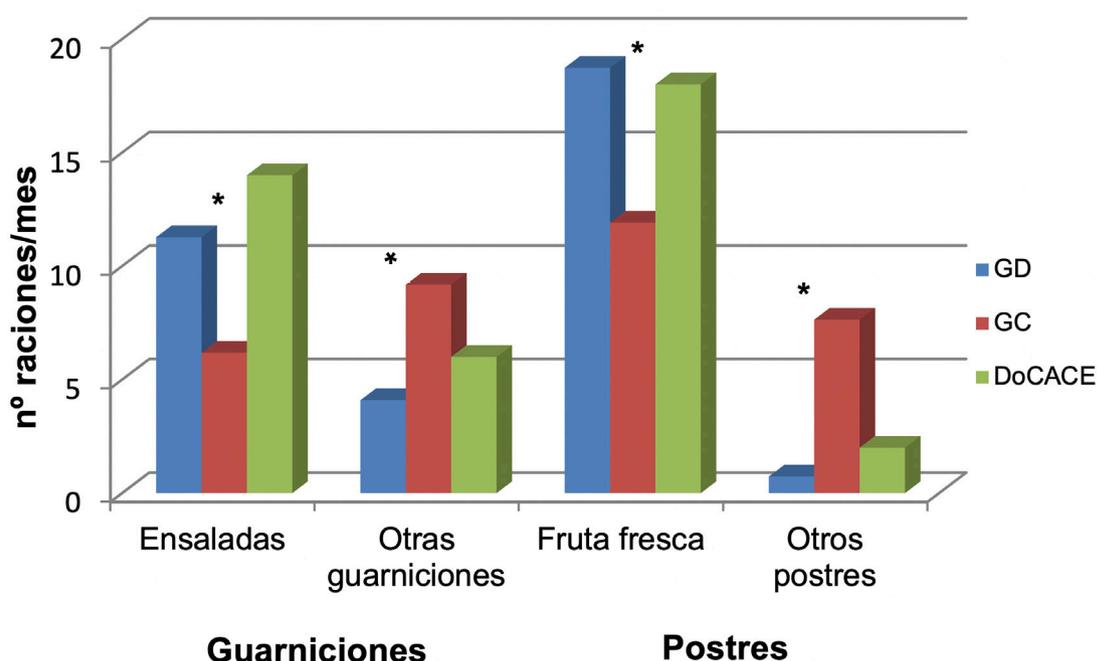
**Figura 18.** Número de raciones ofertadas de segundos platos según el modelo de gestión con las frecuencias semanales recomendadas por el DoCACE (MSPSI, 2010), una vez que se han extrapolado a un ciclo semanal (20 días lectivos).

Por último, para los **postres** se recomienda consumir fruta de temporada, madura y fresca al menos cuatro veces a la semana. Todos los ciclos de GD cumplieron satisfactoriamente al ofrecer una media de 18,73 piezas al mes, mientras que en los menús de GC no se cumplieron en ningún ciclo las recomendaciones mensuales de 16-20 piezas. Solamente se sirvieron 11,91 veces al mes debido a que dos veces por semana solían presentar postre lácteo (yogur), cuando la recomendación es como máximo una vez a la semana. Al menos se priorizó yogur frente a otros productos lácteos más azucarados (natillas, flan, etc.). En ambas modalidades de servicio se rotaba la fruta, principalmente entre pera, manzana, naranja y plátano, pero sería deseable la presencia de otras frutas de temporada.

Otras consideraciones, como que el agua sea la única bebida y el empleo de aceite de oliva para aliñar o el uso en crudo, fueron observadas por las dos modalidades de gestión del servicio de alimentación.

La Figura 19 representa el número de raciones ofertadas de las guarniciones y postres evaluados en función de la modalidad de gestión y comparadas con las frecuencias semanales recomendadas por el DoCACE (MSPSI, 2010), una vez que se han extrapolado a un ciclo semanal (20 días lectivos).

Al comparar nuestros resultados con los de los dos estudios realizados previamente en guarderías, hay que recalcar que estos se basaron en las recomendaciones del Programa PERSEO (MISACO, 2008), aunque Vergara *et al.* (2016) también extrapoló el número de raciones ofertadas de todos los grupos de alimentos a frecuencias mensuales. La oferta de pasta y arroz en los CEI evaluados por Vergara *et al.* (2016), fue ligeramente superior a lo reco-



\*Diferencias significativas ( $<0,001$ )

**Figura 19.** Número de raciones ofertadas de guarniciones y postres según el modelo de gestión

mendado, mientras que las legumbres se ajustaron a lo deseado. Para estos mismos platos, Seiquer *et al.* (2016) consideraron el reparto bastante adecuado. Asimismo, estos últimos autores mostraron una oferta diaria y variada de verduras y otras hortalizas, principalmente en forma cruda como ensalada. En cambio, en los CEI de Sevilla se obtuvieron incumplimientos con las verduras y otras hortalizas. Ambos estudios también mostraron frecuencias menores a las esperadas en el grupo de las frutas (Vergara *et al.*, 2016).

Este déficit de frutas y hortalizas también se ha encontrado en colegios (Zulueta *et al.*, 2011; Berradre-Sáenz *et al.*, 2015; De Mateo *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2016). En el estudio en colegios vascos, se observó que la guarnición vegetal prevista en el menú no se servía en el 40% de las ocasiones y que el 70% de los niños a los que se les servía guarnición vegetal no se la comían. Todos los estudios concluyeron que había que incrementar la oferta de los vegetales (preferiblemente en el primer plato ya que en la guarnición es ineficaz), así como el incremento de frutas en lugar de postres lácteos.

A pesar de las campañas para promocionar el consumo de frutas y hortalizas, como el plan de consumo de estos alimentos en las escuelas (MAGRAMA, 2009), sigue habiendo un rechazo por parte de la población infantil hacia las verduras y frutas debido a factores como el sabor, el color y una falta de disponibilidad. A tenor de nuestros resultados, en los CEI del Ministerio de Defensa se está realizando un esfuerzo notable para la introducción de frutas y verduras según las recomendaciones de la guías, lo que ayuda a explicar los

resultados de fibra, vitaminas y minerales obtenidos, aunque en los menús de GC es mejorable la frecuencia de frutas y ensaladas.

Por otro lado, en los CEI de Granada (Seiquer *et al.*, 2016), los alimentos proteicos de origen animal (carnes, pescados y huevos) se sirvieron acordes a los valores propuestos, como ha ocurrido en los menús de GD de nuestro estudio. En cambio, en los CEI de Sevilla el pescado mostró un valor ligeramente inferior al recomendado y las carnes se presentaron en exceso (Vergara *et al.*, 2016). Este hecho referente al exceso de los alimentos cárnicos y deficitario en pescado y huevos ocurrió también en las escuelas granadinas, vascas, madrileñas, castellanoleonesas y andaluzas (Martínez *et al.*, 2010; Zulueta *et al.*, 2011, Berradre-Sáenz *et al.*, 2015, De Mateo *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2016). Estos autores recomendaron la disminución de carnes y el aumento de pescados y huevos, que ha sido la medida propuesta en nuestro estudio para los menús de GC.

En nuestros resultados se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de oferta de todos los grupos de alimentos, menos en los precocinados, entre la GD y la GC. En la línea de nuestros resultados, Díez *et al.* (2018) también encontraron diferencias significativas en la frecuencia ofertada para los diferentes grupos de alimentos según la modalidad de gestión. Sin embargo, en los estudios realizados en los colegios de Granada y Madrid no encontraron diferencias significativas en la calidad del menú elaborado en cocina propia o por servicio de *catering*, aunque estos últimos ofrecían más carne y menos pescado, huevos y fruta en concordancia con nuestros resultados (Martínez *et al.*, 2010; Berradre-Sáenz *et al.*, 2015). De Mateo *et al.*, (2015) tampoco encontraron diferencias estadísticamente significativas en función del tipo de gestión, aunque el sistema de *catering* ofreció mayor calidad dietética.

En nuestro estudio se tomó como referencia las directrices del DoCACE (MSPSI, 2010), mientras que los estudios de los CEI andaluces (Seiquer *et al.*, 2016; Vergara *et al.*, 2016), como se ha dicho anteriormente, se basaron en el Programa PERSEO (MISACO, 2008). Los últimos estudios publicados en escuelas españolas también utilizaron las recomendaciones del DoCACE, incluso varios de ellos han elaborado cuestionarios o propuesto otras recomendaciones que mejoran las directrices del DoCACE (Morán *et al.*, 2013; De Mateo *et al.*, 2015; Llorens-Ivorra *et al.*, 2016; Díez *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2020b).

De Mateo *et al.* (2015), elaboraron un cuestionario de comedores escolares (COMES) de 15 ítems para la evaluación dietética de los menús escolares en colegios de Castilla y León, siguiendo las directrices del DoCACE. Los 8 primeros hacían referencia a la frecuencia de consumo de alimentos y los restantes a otras características, que se puntuaban con 0 (negativas) ó 1 (afirmativas), valorándose la puntuación final en 4 rangos (muy deficiente, mejorable, aceptable, óptimo). Las frecuencias de consumo que propusieron fueron más restrictivas que las del DoCACE, al considerar que este documento presenta

unos rangos muy amplios para las frecuencias de consumo de los grupos de alimentos más problemáticos en la edad infantil.

En otro estudio posterior, Llorens-Ivorra *et al.* (2016) consideraron el DoCACE bastante completo, pero lo mejoraron incorporando las recomendaciones referidas a la patata frita, pescado azul y frito y aumentaron la cantidad mensual de ensalada, arroz y pasta, legumbres, pescado y huevos. Para ello, diseñaron un cuestionario para la evaluación del equilibrio alimentario y clasificación de menús escolares (EQ-MEs), basado en 17 ítems con una puntuación (0 ó 1), de cuya suma resultó el índice de equilibrio y una escala cualitativa para los intervalos de ese índice (muy poco equilibrado, poco equilibrado, adecuado, equilibrado). Tomaron como base las distintas guías editadas por las CC. AA. y la AESAN y las compararon con las recomendaciones sobre el consumo mensual de grupos de alimentos de países de nuestro entorno. En otro estudio del mismo grupo de investigación (Llorens-Ivorra *et al.*, 2018), probaron este cuestionario empíricamente en 5100 menús de colegios de la Comunidad Valenciana, obteniendo que la mayoría de los menús ofertados fueron adecuados para la población infantil. Para su mejor equilibrio deberían reducir las raciones de patatas fritas, arroz y pasta, carne, fritos y lácteos, e incrementar las de legumbres, pescado, pescado azul y fruta.

Recientemente, otro estudio ha valorado la aplicabilidad del DoCACE como referente para evaluar la adecuación de los menús escolares a las recomendaciones de una alimentación saludable. Para ello, el estudio se centró en los menús mensuales de 28 centros educativos estableciendo categorías (grupos de alimentos presentes en las recomendaciones del DoCACE), que fueron divididas en subcategorías según las características nutricionales de los alimentos de cada grupo. En general, los centros adecuaron la oferta de la mayoría de los grupos de alimentos (legumbres, carnes, pescados, huevos) a las recomendaciones, lo que concuerda con los resultados de los menús de GD de nuestro estudio. Sin embargo, presentaron una oferta superior de otros postres (lácteos y productos azucarados), verduras y otras hortalizas y otras guarniciones, e inferior de frutas, ensaladas, arroz, pasta y precocinados, más en consonancia con los resultados de los menús de GC de los CEI del Ministerio de Defensa. Por otra parte, el análisis por subcategorías puso de manifiesto que dicha oferta no se correspondía con una alimentación saludable (predominio de vegetales cocidos, exceso de carnes procesadas, patatas fritas). Como en otros estudios en colegios que han sido mencionados anteriormente, tampoco obtuvieron diferencias significativas entre la forma de gestión del centro o la existencia de cocina propia. La conclusión del estudio determinó que el DoCACE es una herramienta útil pero precisa una mayor especificidad (Soares *et al.*, 2020b).

Estas consideraciones refuerzan la necesidad de revisar las directrices del DoCACE de acuerdo con el conocimiento científico actual y plasmarlas en una norma junto con un sistema de seguimiento y evaluación. Por otro lado, la heterogeneidad regional de las políticas alimentarias que abordan la alimenta-

ción saludable en las escuelas necesita ser reglamentada con unas directrices consensuadas (Monroy-Parada *et al.*, 2019; Sánchez *et al.*, 2019).

#### **4.3.2.2 Rotación mensual de alimentos**

Respecto a la rotación mensual de alimentos dentro de un mismo grupo se cumplieron las recomendaciones relativas a carnes (dando prioridad a las carnes blancas de ave), fruta, (aunque ya se ha indicado que sería conveniente introducir más fruta de temporada), hortalizas y legumbres. En este último grupo se ofertaron lentejas, garbanzos y judías blancas como en el estudio de Micó *et al.* (2013).

Sin embargo, destaca la falta de variedad en cuanto a pescados. En GD predominó la merluza, siendo la única especie de pescado ofrecida en sus diferentes presentaciones y técnicas culinarias, en 10 de los 11 ciclos evaluados. Enero, fue el único mes que presentó la mínima rotación recomendada de tres especies diferentes de pescado (merluza, halibut y tilapia). En los menús de GC, se rotó el mínimo establecido al alternar merluza con filetes de bacalao, limanda y rosada en seis ciclos de menús. Otros dos meses cumplieron la variedad de tres pescados ya que a la merluza le acompañaron empanadillas de atún y croquetas de bacalao. Este tipo de productos pueden contener cantidades de pescado inferiores a las deseadas y considerarse más bien un precocinado que una ración de pescado, hecho que habría que tener en cuenta.

Además, las empanadillas de atún son uno de los tres platos que contienen pescado azul, junto a la pasta con tomate y atún, y a la tortilla con atún en los menús de GC. En los menús de GD solo aparece pescado graso en dos meses como parte de la tortilla de atún. Esto pone de manifiesto la escasez de pescado azul en los menús, puesto que el DoCACE fomenta la variedad y alternancia de pescados azules y blancos, sugiriendo su disponibilidad en cantidades iguales (MSPSI, 2010). Los pescados azules contienen mayor cantidad de grasa, y su inclusión más frecuente en los menús aportaría mayor cantidad de AG  $\omega$ -3, vitamina D y calcio que han presentado niveles bajos y son fundamentales en el desarrollo del sistema nervioso y en el crecimiento en general.

La explicación a estos resultados por parte de las empresas que diseñaban los menús fue que la merluza era el pescado más aceptado por los niños. Otros pescados provocan rechazo, por ejemplo pescados azules como el atún que resulta seco o las sardinias que presentan demasiadas espinas. Esta aversión puede solventarse con presentaciones sin espinas (lomos, medallones, delicias, albóndigas o hamburguesas de pescado, etc.), siempre y cuando no sean platos precocinados, y con preparaciones con salsas preparadas a base de verduras y otras hortalizas.

En el estudio de Vergara *et al.* (2016), todos los centros cumplían con la rotación de alimentos excepto uno, en el que se ofreció solo merluza en el grupo del pescado. En estudios llevados a cabo en colegios la variedad de pescado se consideró, en general, adecuada (Morán *et al.* 2013, Díez *et al.*, 2018).

Concretamente, en el último de ellos se evaluó la calidad culinaria de los menús escolares de Asturias y la variedad de los alimentos dentro de los diferentes grupos de alimentos tuvo un buen cumplimiento en más del 80% de los centros. Los grupos que no cumplieron los criterios de variedad fueron las frutas (4 variedades/mes) y los carbohidratos ( $\geq 6$  variedades/mes). En el caso de las frutas, realmente no se pudo valorar la variedad ya que aparecía como “fruta de temporada”, quedando sujeto a la disponibilidad en el mercado y al precio. Respecto a los carbohidratos (pasta, arroz y patatas), los colegios con GD ofrecieron más variedad debido, posiblemente, a la mayor flexibilidad que aporta la autogestión (Díez *et al.*, 2018). El estudio de De Mateo *et al.* (2015), también determinó una variedad de alimentos adecuada.

El comedor escolar es un excelente lugar para la aceptación de nuevos platos, oportunidad que deber aprovecharse para dar a conocer los distintos tipos de alimentos dentro de un mismo grupo.

#### **4.3.2.3 Rotación de recetas**

La rotación de las recetas a lo largo de dos semanas consecutivas es un punto a mejorar en los menús de GD, como muestra la Tabla 65. Respecto a los primeros platos, las patatas guisadas fueron la receta que más se repetía, seguida de pisto, platos con base de arroz (arroz con tomate, arroz tres delicias, ensalada de arroz) y pasta con tomate. La repetición de recetas en los segundos platos de pescado fue mayor que en las carnes. Principalmente se repetía la receta de merluza en salsa verde y los jamoncitos de pollo asados.

En el estudio de Vergara *et al.* (2016), encontraron que en 5 de los 6 CEI repetían excesivamente las recetas para un mismo grupo de alimentos, sobre todo aquellos usados como guarnición. En los colegios asturianos, la recomendación de no repetir receta en una misma quincena tuvo un cumplimiento aceptable, siendo mejor en los colegios con GC (Díez *et al.*, 2018), en consonancia con nuestro estudio, si bien cabe destacar, que un alto porcentaje de colegios no especificaban la receta empleada (“verduras”, “carnes”, “pescado”; “pescado azul”, “pescado blanco”), lo que implica una limitación para valorar la calidad dietética.

#### **4.3.2.4 Variedad de técnicas culinarias**

Ambas modalidades de gestión utilizaron una correcta variedad de técnicas culinarias. Los principales procesos que utilizaron, tanto en primeros como en segundos platos fueron el hervido, guiso, horneado, plancha y fritura. En el grupo de alimentos de verduras y otras hortalizas se apreció algún mes con excesiva presencia de cremas o purés, que se podría alternar con alguna otra técnica como, por ejemplo, salteados. En GD los huevos siempre se presentaron como tortilla con diferentes ingredientes (jamón york, queso, calabacín o atún). Sería recomendable dar a conocer a los niños otros procesos diferentes de elaboración del huevo, como por ejemplo el cocido o hervido (huevos villarroy ofertados en GC). En esta modalidad de *catering*, Díez *et al.* (2018)

encontraron limitaciones en la variedad de recetas y técnicas culinarias del huevo (tortilla de patata en salsa o huevo cocido) debido al transporte en frío y el calentamiento posterior.

Vergara *et al.* (2016) también encontraron una correcta variedad de técnicas culinarias en los menús de los CEI estudiados, con un mayor empleo de hervidos y horneados en detrimento de los fritos.

En el estudio de Morán *et al.* (2013) sobre la efectividad de un sistema de asesoramiento dietético, la insuficiente rotación de técnicas culinarias no fue causa de modificaciones en los menús por parte de los asesores. En los colegios de Castilla y León también se cumplió satisfactoriamente esta recomendación, aunque la presencia en los menús de fritos, rebozados y empanados fue alta (De Mateo *et al.*, 2015). Por último, en la evaluación de los menús ofertados en colegios públicos, privados y concertados, Castro *et al.*, (2016) concluyeron que se debía ampliar la variedad de técnicas empleadas para la elaboración de las recetas.

#### 4.3.2.5 Otras recomendaciones

Es importante recalcar que en las planillas de los menús de las dos gestiones de nuestro trabajo, se incluye la información energética y la aportación de cada macronutriente. Para ayudar a los padres a completar las necesidades energéticas con el resto de comidas del día, la empresa de GD sugiere en las citadas planillas el menú de la cena y la empresa subcontratada de GC propone menús para la merienda. En el estudio en CEI, Vergara *et al.* (2016), siguiendo el manual de ejecución del Programa de Evaluación de Menús de la Junta de Andalucía (Moreno y Pérez-Rendón, 2010), también evaluaron la información detallada en los menús para que los padres pudieran completar la dieta de sus hijos de la manera más correcta posible. En 4 de los 6 CEI encontraron deficiencias en la información facilitada en los menús, principalmente a la hora de especificar los tipos de frutas, componentes de la guarnición y a una denominación demasiado general de las recetas.

Morán *et al.* (2013) analizó las causas más recurrentes de modificaciones de los menús escolares, resultando ser la más frecuente la información incompleta de los platos aportada por los menús (51%). Castro *et al.* (2016) también concluyeron que se debía ampliar la información aportada por el menú.

Por otro lado, uno de los *items* incluidos en el cuestionario COMES fue la información de las planillas de los menús, ya que consideraban que la información era escasa, no lo suficientemente clara y difícil de interpretar por los padres (De Mateo *et al.*, 2015).

Llorens-Ivorra *et al.* (2016) incluyeron dentro de los *items* de su cuestionario EQ-MEs la información de los platos del menú. Consideraron que un menú estaba mal informado cuando no especificaba su ingrediente principal y secundario y, para que pudiera ser evaluable, no podían estar mal informados más de 5 menús de los 20 días de un ciclo mensual. También propusieron otro

criterio de calidad: la combinación del primer y segundo plato. Así, un menú diario estaba mal combinado cuando el ingrediente principal del primer plato era del mismo grupo que el del segundo plato, o la guarnición del segundo era del mismo grupo que del ingrediente principal del primero.

Díez *et al.* (2018) también evaluaron la especificación de los alimentos y de las recetas como ya hemos descrito anteriormente. Dentro de los grupos de alimentos, especificaron siempre las variedades concretas de pescado solo un 26,7%, de aceite un 16,4%, de fruta un 15,4%, de sal un 9,7% y las variedades de verdura un 2,1%. En la especificación de recetas utilizadas por grupos de alimentos especificaron en pescados un 37,9%, en patatas un 27,2%, en carnes un 11,3% y en verduras un 5,1%.

En nuestro estudio, también se ha encontrado una información incompleta. En los menús de GD los mayores incumplimientos se cometieron al no especificar en los segundos platos la especie animal de la carne o del pescado blanco y en las guarniciones los componentes de la ensalada y verdura. En GC, a parte de los mismos incumplimientos en cuanto al tipo de carne y componentes de la guarnición, también faltó por especificar el ingrediente principal de algunos primeros platos (puré de verduras, crema de hortalizas) y el tipo de fruta ofrecida. También se mencionó la técnica culinaria en ambas modalidades de gestión, aunque se detectó alguna omisión puntual del proceso culinario empleado.

Finalmente, en ambas empresas fue personal con formación en nutrición quien se encargó del diseño de los menús. En este sentido, la empresa subcontratada de *catering* conocía y utilizaba como referencia el DoCACE. En el estudio de Berradre-Sáenz *et al.* (2015), el 65,5% de los colegios encuestados desconocía la existencia de este documento. El 70,3% tenía identificada a una persona responsable de supervisar el menú y el 54,8% de los responsables del menú tenían formación acreditada en dietética y nutrición. En sus resultados no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la adherencia a las recomendaciones del DoCACE en función de tener o no un responsable del menú. Sin embargo, concluyeron la conveniencia de contar con profesionales con formación acreditada en nutrición y dietética. Asimismo, tras el gran desconocimiento del DoCACE, recomendaron impulsar estrategias de difusión e implementación de sus recomendaciones.

La discusión de nuestros resultados, pone en evidencia que es necesario legislar en España unos estándares que permitan la comparación de resultados entre estudios, y más concretamente dirigidas a edad preescolar usuaria de comedores en CEI. Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio podrían ayudar a la unificación de criterios y así poder establecer unos valores de referencias o límites únicos, tanto en aspectos nutricionales como dietéticos (composición y variedad de los menús y calidad culinaria), que permitan obtener datos comparables en la población preescolar.

Otra medida a tener en cuenta para mejorar los desequilibrios encontrados sería la aplicación de programas de intervención nutricionales. Una reciente

revisión sistemática sobre las intervenciones escolares realizadas en España a lo largo de la etapa de Educación Primaria (6 a 12 años), ha reportado que cinco de los nueve estudios revisados mostraron resultados significativos en torno a la mejora de los hábitos alimentarios. En general, todas las intervenciones contribuyeron a la adopción de un patrón de alimentación más equilibrado (aumento en la ingesta de fruta, verduras y fibra y reducción de azúcares) (López-Gil *et al.*, 2020). Estos autores han observado la falta de estudios con intervenciones realizadas en el ámbito escolar y consideran importante recomendar la realización de un mayor número de intervenciones nutricionales, incluyendo también a otras edades (Educación Infantil, Educación Secundaria, etc.).

Por último, los menús especiales dirigidos a niños con reacciones de hipersensibilidad alimentaria están cada vez más presentes en los comedores de los CEI debido al aumento de la prevalencia de las mismas y la exigencia legal de ofrecer menús especiales y alternativos en los comedores escolares. Estos menús deben ser equilibrados nutricionalmente y ofertarse según las recomendaciones propuestas para los menús basales. Un reciente estudio (García *et al.*, 2019) ha analizado los menús sin gluten en comedores escolares de Granada obteniendo unos resultados, en términos generales, equilibrados. La pasta sin gluten fue la base del primer plato, en el segundo plato la carne excedió las recomendaciones y las verduras y frutas se ofertaron adecuadamente. La ingesta energética y distribución de macronutrientes también fue correcta, aunque con una cantidad media superior a lo recomendado de hidratos de carbono y fibra. La ingesta de calcio y vitamina D no alcanzó lo aconsejado y el sodio presentó un consumo elevado. Estas irregularidades observadas suelen ser comunes también a lo publicado sobre menús basales no dirigidos a niños celíacos. Por tanto, la evaluación nutricional de este tipo de menús en los CEI del Ministerio de Defensa debe considerarse como una acción futura.



## **CAPÍTULO V**

---

# **INVESTIGACIÓN DE SUSTANCIAS CAUSANTES DE ALERGIAS E HIPERSENSIBILIDADES NO ALÉRGICAS EN LOS MENÚS ESPECIALES**



## **CAPÍTULO V. INVESTIGACIÓN DE SUSTANCIAS CAUSANTES DE ALERGIAS E HIPERSENSIBILIDADES NO ALÉRGICAS EN LOS MENÚS ESPECIALES**

El **objetivo** específico de este capítulo es investigar, en los menús especiales, la presencia de las sustancias causantes de alergias e hipersensibilidades no alérgicas a los alimentos de mayor prevalencia en edad infantil.

Para ello, se ha investigado la presencia de proteína de leche, de proteína de huevo y de gluten en los menús especiales servidos en los CEI del Ministerio de Defensa. Además, se ha evaluado la metodología y los resultados analíticos en base a los criterios de aceptación establecidos por el laboratorio de referencia (CNA) y los laboratorios de control oficial de las CC. AA.

### **5.1 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.1.1 Diseño**

Se realizó un estudio observacional transversal de la presencia de proteína de leche, de proteína de huevo y de gluten en los menús especiales servidos en los comedores de los CEI del Ministerio de Defensa, durante el curso 2017-2018 y 2018-2019.

#### **5.1.2 Población a estudio**

El estudio se ha centrado en los siguientes tipos de menús especiales:

- Menú especial sin leche y sus derivados.
- Menú especial sin huevo y sus derivados.
- Menú especial sin gluten.

De los 25 CEI existentes en el Ministerio de Defensa, las muestras procedieron de los 17 CEI que durante el curso 2017-2018 o 2018-2019 tuvieron usuarios con alergia a la proteína de leche, a la proteína de huevo o celiaquía y, por tanto, elaboraron o sirvieron alguno de los tres menús especiales.

La prevalencia de las dos alergias y celiaquía, entre los niños usuarios de los 25 comedores de los CEI fue del 3,2% (1,7% a la proteína de leche, 1% a la proteína de huevo y 0,5% al gluten). La Figura 20 muestra el porcentaje de hipersensibilidad a la leche, al huevo y al gluten entre el número total (76) de diagnosticados con alguna de esas hipersensibilidades.

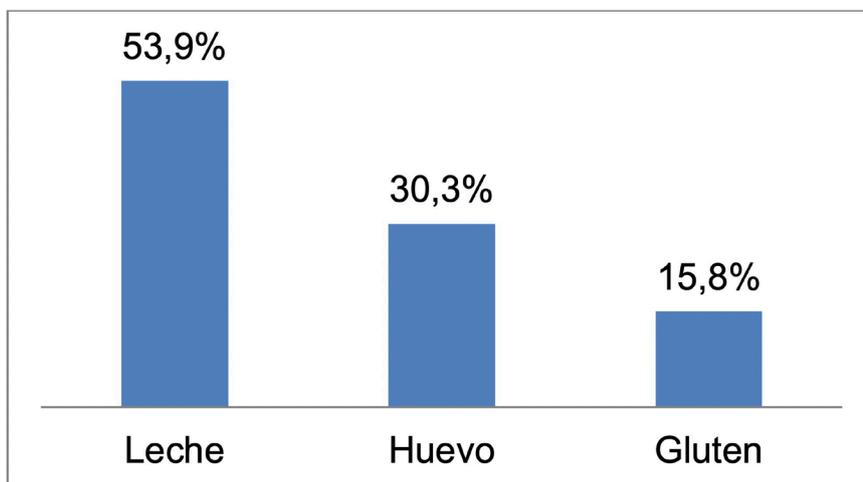


Figura 20. Porcentaje de hipersensibilidad a la leche, al huevo y al gluten entre el número total de diagnosticados con alguna de esas hipersensibilidades

La Figura 21 muestra la distribución de las hipersensibilidades a las tres sustancias estudiadas, según el sexo y edad de los afectados.

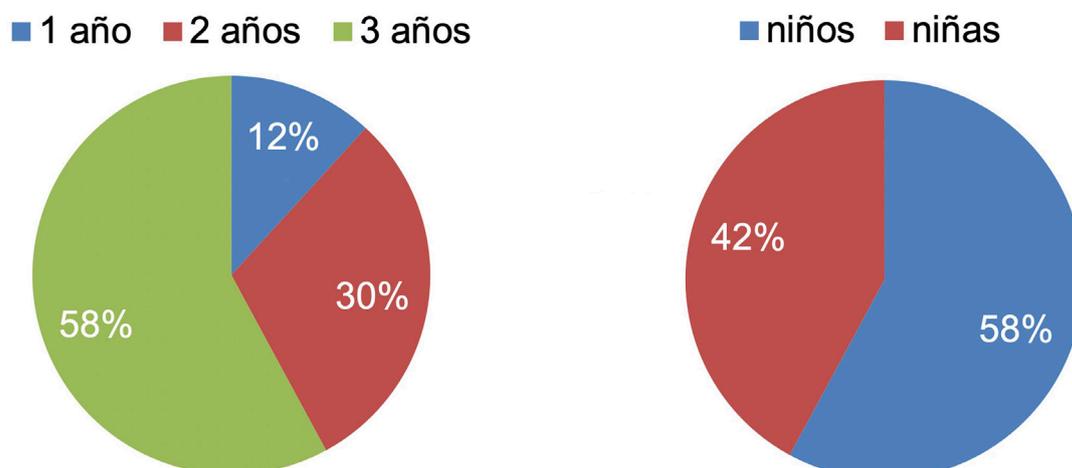


Figura 21. Distribución de los casos por edad y distribución de los casos por sexo

### 5.1.3 Muestreo

Durante el año 2018, se realizó una campaña de control oficial de los menús especiales servidos en los comedores en los CEI del Ministerio de Defensa, realizándose el muestreo según criterio de la autoridad sanitaria (IGESANDEF).

Se consideraron menús especiales aquellos libres de proteína de leche, de proteína de huevo y de gluten. Para la ejecución de la campaña de control oficial, el veterinario inspector responsable de cada CEI realizó un muestreo consecutivo no probabilístico de los menús especiales.

Las muestras estaban constituidas por la porción equivalente a una ración servida del primer y segundo plato de los menús especiales. Las muestras se

tomaron de tal manera que se evitó el contacto cruzado y se introdujeron en un recipiente estéril, que se precintó, etiquetó y envió para su análisis en el laboratorio a temperatura de refrigeración o congelación (se descongelaron en refrigeración). En el Laboratorio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública del CEMILVETDEF se aceptaron las muestras de los menús especiales que se recibieron perfectamente empaquetadas e identificadas y sin pérdida de la cadena de frío.

La remisión de las muestras estuvo supeditada al cumplimiento de la campaña de control oficial planificada por la autoridad sanitaria (IGESANDEF). En consecuencia, en el diseño de este estudio, no se pudo calcular estadísticamente el tamaño muestral necesario. Al final de la campaña de control de alérgenos en CEI, el número total de muestras recibidas y analizadas fue 133 (Tabla 66).

**Tabla 66.** Número de muestras (n) de cada menú especial.

Tipo de menú	n
Sin proteína de leche	59
Sin proteína de huevo	34
Libre de gluten	40
Total	133

#### 5.1.4 Metodologías de análisis

El control analítico de las muestras se realizó en el Laboratorio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública del CEMILVETDEF, certificado bajo la Norma ISO 17025:2017. Para ello, se utilizaron kits comerciales de la casa comercial R-Biopharm, basados en la técnica inmunoenzimática ELISA y validados por la AOAC International.

##### 5.1.4.1 Determinación de proteína de leche en menús especiales

###### 5.1.4.1.1 Material

- Balanza A&D HR220i.
- Espectrofotómetro Thermo MultiskanGo.
- Molinillo Waring Commercial-Laboratory.
- Agitador magnético calefactor Arec.
- Baño caliente P Selecta Precistern.
- Centrífuga Eppendorf 5430R.
- Probetas 100 ml.
- Matraz Erlenmeyer 1 l.
- Micropipetas de 20-200 µl y 100-1000 µl Eppendorf Reference 2.

- Micropipetas multicanal 10-100 Eppendorf Reference 2  $\mu$ l y 30-300  $\mu$ l Eppendorf Research Plus.
- Tubos falcon 15 ml y 50 ml.
- Tubos eppendorf 1,5 ml.
- Envase de recogida de muestras estéril 100 ml.
- Espátulas estériles desechables LabBox SPSP 150-005.
- Papel de filtro de pliegue Whatman 185 mm  $\varnothing$ .

#### 5.1.4.1.2 Reactivos

- Agua desionizada Ellox Millipore.
- Etanol al 40%.
- Hidróxido de sodio 1 M Applichem Panreac.
- Ácido clorhídrico 1 M Applichem Panreac.
- Kit RIDASCREEN® FAST Milk, con el que se suministran los siguientes reactivos:
  - o Estándares de calibración.
  - o Extractor 2: diluido 1:2 con agua desionizada.
  - o AEP: diluido 1:10 con agua desionizada.
  - o A-AEP: para preparar A-AEP se pesó 1,35 g de aditivo 1 y se añadieron 15 ml 1 M NaOH, agitando hasta que el aditivo 1 se disolviera. En un matraz se añadieron 700 ml de AEP y los 15 ml de la solución de aditivo 1 agitando constantemente. Se ajustó a pH 9 con 1 M HCl y se completó hasta 750 ml con AEP.
  - o Tampón de lavado: diluido 1:10 con agua desionizada.
  - o Conjugado: diluido 1:11 con agua desionizada.
  - o Sustrato-cromógeno.
  - o Solución de parada.

#### 5.1.4.1.3 Método analítico

El kit RIDASCREEN® FAST Milk, se basa en la técnica ELISA tipo sándwich, con anticuerpos específicos para las dos principales proteínas alergénicas en la leche: caseína y  $\beta$ -lactoglobulina. La curva de calibración cubre un rango de 2,5 a 67,5 mg/kg de proteína de leche (5 estándares de 0; 2,5; 7,5; 22,5 y 67,5 mg/kg). El límite de detección es de 0,7 mg/kg y el límite de cuantificación de 2,5 mg/kg.

#### **5.1.4.1.3.1 Preparación y extracción**

Las superficies y el material (molinillo y cucharas) empleado para la homogeneización de las muestras, se limpiaron exhaustivamente con una solución de etanol 40% entre muestra y muestra para evitar el contacto cruzado.

Se pesó 1 g de la muestra homogeneizada y se añadieron 4 ml del reactivo extractor 2 diluido.

- Se mezcló enérgicamente y se incubó a 100°C durante 10 minutos en un baño de agua.
- Se dejó enfriar y se añadieron 16 ml del reactivo A-AEP, previamente calentado a 60°C.
- Se mezcló enérgicamente y se incubó a 60°C durante 10 minutos en un baño de agua.
- Se enfrió y se centrifugó durante 10 minutos a 2500 g.
- Se filtró el sobrenadante sobre un papel filtro de pliegues.
- Finalmente, se diluyó la muestra 1:5 con el reactivo AEP diluido.

#### **5.1.4.1.3.2 Detección y cuantificación**

Se realizó en un espacio separado del de la preparación y extracción y la mesa de trabajo se limpió exhaustivamente con una solución de etanol al 40%, antes del inicio de la determinación.

- Se añadieron 100 µl de cada solución estándar y de cada muestra en los pocillos, por duplicado, y se incubó la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se eliminó el líquido de los pocillos en un papel absorbente y se rellenaron los pocillos con 250 µl de tampón de lavado diluido. Este paso se repitió tres veces más.
- Se añadieron 100 µl de conjugado diluido en cada pocillo. Se mezcló suavemente agitando la placa manualmente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se eliminó el líquido de los pocillos en un papel absorbente y se rellenaron los pocillos con 250 µl de tampón de lavado diluido. Este paso se repitió tres veces más.
- Se añadieron 100 µl del sustrato-cromógeno en cada pocillo, se mezcló suavemente agitando la placa manualmente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.
- Se añadieron 100 µl de la solución de parada en cada pocillo. Se mezcló suavemente agitando la placa manualmente y se midió la absorbancia a 450 nm.

#### **5.1.4.2 Determinación de proteína de huevo en menús especiales**

##### **5.1.4.2.1 Material**

- Balanza A&D HR220i.
- Espectrofotómetro Thermo MultiskanGo.
- Molinillo Waring Commercial-Labortory.
- Agitador magnético calefactor Arec.
- Baño caliente P Selecta Precistern.
- Centrífuga Eppendorf 5430R.
- Probetas 100 ml.
- Matraz Erlenmeyer 1 l.
- Micropipetas de 20-200 µl y 100-1000 µl Eppendorf Reference 2.
- Micropipetas multicanal 10-100 Eppendorf Reference 2 µl y 30-300 µl Eppendorf Research Plus.
- Tubos falcon 15 ml y 50 ml.
- Tubos eppendorf 1,5 ml.
- Envase de recogida de muestras estéril 100 ml.
- Espátulas estériles desechables LabBox SPSP 150-005.

##### **5.1.4.2.2 Reactivos**

- Agua desionizada Ellox Millipore.
- Etanol al 40%
- Kit RIDASCREEN® FAST Ei/EggProtein, con el que se suministran los siguientes reactivos:
  - o Estándares de calibración.
  - o AEP: diluido 1:10 con agua desionizada.
  - o Tampón de lavado: diluido 1:10 con agua desionizada.
  - o Conjugado: diluido 1:11 con agua desionizada.
  - o Sustrato-Cromógeno.
  - o Solución de parada.

##### **5.1.4.2.3 Método analítico**

El kit RIDASCREEN® FAST Ei/EggProtein, se basa en la técnica ELISA tipo sándwich con anticuerpos específicos para la detección de ovoalbúmina y ovomucoide del huevo. La curva de calibración cubre un rango de 0,5 a 13,5

mg/kg de proteína de huevo (5 estándares de 0; 0,5; 1,5; 4,5 y 13,5 mg/kg). El límite de detección es de 0,1 mg/kg y el límite de cuantificación de 0,5 mg/kg.

#### **5.1.4.2.3.1 Preparación y extracción**

Las superficies y el material (molinillo y cucharas) empleado para la homogeneización de las muestras, se limpiaron exhaustivamente con una solución de etanol 40% entre muestra y muestra para evitar el contacto cruzado.

- Se pesó 1 g de la muestra homogeneizada y se añadieron 20 ml del AEP diluido, previamente calentado a 60°C.
- Se mezcló enérgicamente y se incubó a 60°C durante 10 minutos.
- Se dejó enfriar, se centrifugó durante 10 minutos a 2500 g a 4°C y se filtró el extracto.

#### **5.1.4.2.3.2 Detección y cuantificación**

Se realizó en un espacio separado del de la preparación y extracción y la mesa de trabajo se limpió exhaustivamente con una solución de etanol 40%, antes del inicio de la determinación.

- Se añadieron 100 µl de cada solución estándar y de cada muestra en los pocillos por duplicado, se mezcló suavemente agitando la placa manualmente y se incubó la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se eliminó el líquido de los pocillos en un papel absorbente y se rellenaron los pocillos con 250 µl de tampón de lavado diluido. Este paso se repitió dos veces más.
- Se añadieron 100 µl de conjugado diluido en cada pocillo. Se mezcló suavemente agitando la placa manualmente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se eliminó el líquido de los pocillos en un papel absorbente y se rellenaron los pocillos con 250 µl de tampón de lavado diluido. Este paso se repitió dos veces más.
- Se añadieron 100 µl del sustrato-cromógeno en cada pocillo, se mezcló suavemente agitando la placa manualmente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.
- Se añadieron 100 µl de la solución de parada en cada pocillo. Se mezcló suavemente agitando la placa manualmente y se midió la absorbancia a 450 nm.

#### **5.1.4.3 Determinación de gluten en menús especiales**

##### **5.1.4.3.1 Material**

- Balanza A&D HR220i.
- Espectrofotómetro Thermo MultiskanGo.

- Molinillo Waring Commercial-Laboratory.
- Agitador magnético calefactor Arec.
- Baño caliente P Selecta Precistern.
- Centrífuga Eppendorf 5430R.
- Probetas 100 ml.
- Matraz Erlenmeyer 1 l.
- Micropipetas de 20-200  $\mu$ l y 100-1000  $\mu$ l Eppendorf Reference 2.
- Micropipetas multicanal 10-100 Eppendorf Reference 2  $\mu$ l y 30-300  $\mu$ l Eppendorf Research Plus.
- Tubos falcon 15 ml y 50 ml.
- Tubos eppendorf 1,5 ml.
- Envases de recogida de muestras estéril 100 ml.
- Espátulas estériles desechables LabBox SPSP 150-005.

#### 5.1.4.3.2 Reactivos

- Agua desionizada Ellox Millipore.
- Etanol al 80% y al 40%
- Leche en polvo desnatada Nestlé Sveltesse.
- *Cocktail (patented)* R7006 (R-Biopharm)
- Kit RIDASCREEN® Gliadin R7001, con el que se suministran los siguientes reactivos:
  - o Estándares de calibración
  - o Tampón de dilución: diluido 1:5 con agua desionizada.
  - o Tampón de lavado: diluido 1:10 con agua desionizada.
  - o Conjugado: diluido 1:11 con agua desionizada.
  - o Sustrato.
  - o Cromógeno.
  - o Solución de parada.

#### 5.1.4.3.3 Método analítico

El kit RIDASCREEN® Gliadin R7001 se basa en la técnica ELISA tipo sándwich basado en el anticuerpo monoclonal R5 que reacciona con las fracciones

de gliadina y prolamina. La curva de calibración cubre un rango de 5 a 80 ng/ml de gliadina (6 estándares de 0; 5; 10; 20; 40 y 80 ng/ml de gliadina). El límite de detección es de 0,5 mg/kg y el límite de cuantificación de 2,5 mg/kg.

#### **5.1.4.3.3.1 Preparación y extracción**

Las superficies y el material (molinillo y cucharas) empleado para la homogeneización de las muestras, se limpiaron exhaustivamente con una solución de etanol 40% entre muestra y muestra para evitar el contacto cruzado.

- Se pesaron 0,25 g de la muestra homogeneizada y se añadieron 2,5 ml del reactivo *cocktail* (patentado). Para las muestras que contenían taninos y polifenoles se añadieron 0,25 g de leche desnatada en polvo.
- Se incubaron a 50°C durante 40 minutos y se dejaron enfriar las muestras, para a continuación agregar 7,5 ml de etanol 80%.
- Se agitaron rotatoriamente durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C).
- Se centrifugaron 10 minutos al menos a 2500 g a temperatura ambiente, se filtraron los extractos y se transfirieron a un vial con tapa a rosca.
- Finalmente, se diluyó la muestra 1:12,5 (80 µl +920 µl) con el tampón de dilución diluido.

#### **5.1.4.3.3.2 Detección y cuantificación**

Se realizó en un espacio separado del de la preparación y extracción y la mesa de trabajo se limpió exhaustivamente con una solución de etanol 40%, antes del inicio de la determinación.

- Se añadieron 100 µl de cada solución estándar y de cada muestra en los pocillos por duplicado y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se eliminó el líquido de los pocillos en un papel absorbente y se rellenaron los pocillos con 250 µl de tampón de lavado diluido. Este paso se repitió dos veces más.
- Se añadieron 100 µl de conjugado diluido en cada pocillo y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se eliminó el líquido de los pocillos en un papel absorbente y se rellenaron los pocillos con 250 µl de tampón de lavado diluido. Este paso se repitió dos veces más.
- Se añadieron 50 µl de sustrato y 50 µl de cromógeno en cada pocillo, se mezcló suavemente agitando la placa manualmente y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

- Se añadieron 100 µl de la solución de parada en cada pocillo. Se mezcló suavemente agitando la placa manualmente y se midió la absorbancia a 450 nm.

### 5.1.5 Control de calidad de las metodologías de análisis

Con el fin de comprobar la calidad de los resultados obtenidos con los kits comerciales utilizados, aparte del uso de controles blancos de matriz, se evaluaron los siguientes parámetros en base a los criterios de aceptación establecidos por el CNA y los laboratorios de control oficial de las CC.AA (Prieto, 2017): comprobación de la curva de calibrado, estudio de la exactitud y estudio de la precisión.

#### 5.1.5.1 Comprobación de la curva de calibrado

Para calcular la concentración de las muestras problema se creó una curva de calibración con estándares de concentración conocida, preparados a partir de soluciones certificadas incluidas en los kits comerciales ELISA R-Biopharm. Se consideró el criterio recomendado por el fabricante para las curvas tipo *cubic spline*, normalizando cada uno de los puntos (estándares de calibración) de la curva patrón, respecto al punto de absorbancia máxima (B/Bmax).

$$B/B_{max} \text{ estándar } X = \frac{\text{Absorbancia estándar } X}{\text{Absorbancia estándar Máx}} \times 100$$

En total se hicieron 11 ensayos de sustancias causantes de alergias o hipersensibilidad no alérgica alimentaria: 5 de leche, 3 de huevo y 3 de gluten. Para los ensayos de proteína de leche y de huevo se utilizaron 5 estándares incluidos en el kit comercial correspondiente (RIDASCREEN® FAST Milk: 0; 2,5; 7,5; 22,5 y 67,5 mg/kg y RIDASCREEN® FAST Ei/EggProtein: 0; 0,5; 1,5; 4,5 y 13,5 mg/kg) y para la cuantificación de gluten 6 estándares (RIDASCREEN® Gliadin R7001: 0; 5; 10; 20; 40 y 80 ng/ml de gliadina). Por tanto, se realizaron un total de 58 determinaciones para la aceptación de la curva en función de los B/Bmax obtenidos.

El **criterio de aceptación** establecido fue de una tolerancia máxima **del 30% (70-130%)** para cada uno de los puntos de la curva obtenidos en el ensayo respecto a los resultados de B/Bmax obtenidos en el certificado de calidad del kit.

#### 5.1.5.2 Estudio de la exactitud

En nuestro estudio evaluamos la exactitud sobre muestras fortificadas individuales, adicionando cantidades conocidas de un MR directamente sobre matriz antes de comenzar la extracción. Ello nos permitió calcular el rendimiento del método analítico en cuanto al proceso de extracción y el efecto matriz. Como matrices, se utilizaron rotatoriamente diferentes platos elaborados que habían dado un resultado negativo en ensayos anteriores.

Los MR utilizados para fortificar las matrices control fueron los siguientes:

- **MR MoniQA:** se trata de cuatro materiales para el análisis de proteína de leche comercializados por MoniQA (*International Association for Monitoring and Quality Assurance in the Total Food Supply Chain*).
  - o Control positivo SMP-MQA 092014: leche desnatada en polvo con un contenido proteico de  $35,39 \pm 0,4$  g/100 g.
  - o Control negativo BLANK-MQA 082015: matriz de galleta libre de gluten a la que no se le añade leche desnatada en polvo y se le somete al procesado y molienda.
  - o Material procesado LOW-MQA 102016: galleta procesada molida a la que se le ha adicionado el MQA 092014.
  - o Material procesado HIGH-MQA 082016: galleta procesada molida a las que se le ha adicionado el MQA 092014.

En la Tabla 67 se indican los valores de referencia de estos dos últimos MR, que el fabricante obtuvo tras un estudio utilizando el mismo kit empleado en esta Tesis Doctoral (ELISA RIDASCREEN® FAST Milk).

**Tabla 67.** Valores de referencia de los materiales de referencia MoniQA (mg/kg de proteína láctea).

Materiales de referencia MoniQA	mg/kg proteína láctea	U (k=2)
LOW-MQA 102016	3,20	1,76
HIGH-MQA 082016	14,6	7,25

U: Incertidumbre

- **MR FAPAS** (TYG001, TYG002 y T27204AQC): los 3 MR están elaborados con pastel libre de gluten, huevo y leche a los que se le adicionó ingredientes con una cantidad determinada de gluten, leche y huevo. Los valores y las incertidumbres de los tres MR mostrados en la Tabla 68, proceden de un ejercicio interlaboratorial en el que emplearon diferentes kits ELISA, entre los que se encontraban los tres Kits usados en nuestra Tesis Doctoral.

**Tabla 68.** Valores de referencia de los materiales de referencia FAPAS (en mg/kg).

Analito	FAPAS TYG001		FAPAS TYG002		FAPAS T27204AQC	
	mg/kg	U	mg/kg	U	mg/kg	U
Proteína de leche	28,6	4,8	90,6	17,7	54,3	27,2
Proteína de huevo	83,5	9,5	27,5	3,8	31,3	15,7
Gluten	14,4	1,7	28,2	2,4	24,0	12,0

U: Incertidumbre

También se utilizó un sobrante de ensayo de intercomparación en el que se había participado, para evaluar la exactitud mediante la recuperación del mismo:

- **Sobrante de ensayo de intercomparación (IC327):** el valor de referencia es el valor asignado expresado como la media de los resultados aceptados de los participantes, acompañado de la incertidumbre asociada con un intervalo de confianza del 95%. En este ejercicio el valor de referencia de gluten fue de  $28,2 \pm 2,3$  mg/kg.

En la Tabla 69 se muestran las determinaciones que se han realizado con cada material de referencia. En total, 31 determinaciones para evaluar la exactitud.

**Tabla 69.** Número de determinaciones realizadas con cada material de referencia para determinar la exactitud de cada tipo de ensayo.

Material de referencia	Proteína de leche	Proteína de huevo	Gluten
MoniQALow	5	0	0
MoniQA High	5	0	0
FAPAS 27204AQC	2	2	1
FAPAS TYG001	2	3	3
FAPAS TYG002	0	3	3
IC 327	0	0	2

El **criterio de aceptación** establecido para determinar la exactitud fue un porcentaje de recuperación del **30%** para la determinación de **proteína de leche y huevo (70-130%)** y del **20%** para el **gluten (80-120%)**.

### 5.1.5.3 Estudio de la precisión

El estudio de la precisión se realizó en condiciones de repetibilidad: mismo método, mismo laboratorio, mismo analista, mismo material y equipos en intervalos cortos de tiempo.

El **criterio de aceptación** establecido se basó en el **coeficiente de variación (CV)** permitido para el duplicado de pocillo, que no debía superar el **15%**, tanto para los estándares, muestras control y muestras problema.

### 5.1.6 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables estudio con el cálculo de frecuencias y como índices de tendencia central y dispersión se emplearon la media aritmética y la desviación estándar  $\bar{x}$  (DE).

Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS® 24.0.

## 5.2 RESULTADOS

### 5.2.1 Detección y cuantificación de proteína de leche, proteína de huevo y de gluten en los menús especiales

De las 133 muestras analizadas de menús especiales, solo 2 de ellas resultaron positivas a la detección y cuantificación de proteína de leche, proteína de huevo y gluten (1,50%). En concreto, se detectó la presencia de proteína de leche en un plato de los menús especiales sin leche (1,69%) y el otro positivo fue a gliadina en un plato de un menú especial libre de gluten (2,55%). En la Tabla 70 se muestran los alimentos implicados y la sustancia detectada.

**Tabla 70.** Muestras positivas y concentración de las sustancias estudiadas que causan alergias o hipersensibilidades no alérgicas alimentarias.

Muestra	Sustancia	mg/kg
Judías verdes	Proteína de leche	5,3
Macarrones con tomate y queso	Gluten	>100

### 5.2.2 Control de calidad de las metodologías de análisis

#### 5.2.2.1 Comprobación de la curva de calibrado

El 91,4% de las evaluaciones de los estándares resultaron aceptables, cumpliendo el 30% (70-130%) de tolerancia máxima de la B/Bmax para la aceptación de la curva. En la tabla 71 se recogen los valores medios del porcentaje de B/Bmax de los estándares de cada tipo de ensayo.

**Tabla 71.** Resultados del estudio de comprobación de la curva de calibración.

Analito (n.º ensayos)	$\bar{x}$ % B/Bmax ensayo vs. B/Bmax kit (DE)					
	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6
Proteína leche (5)	128,60 (116,69)	123,43 (57,31)	112,45 (25,06)	104,78 (8,04)	100* (0,00)	-
Proteína huevo (3)	104,42 (23,30)	103,87 (8,33)	99,77 (2,64)	101,75 (5,50)	100* (0,00)	-
Gluten (3)	101,29 (18,74)	94,69 (5,49)	96,59 (0,67)	99,99 (4,98)	97,81 (0,63)	100* (0,00)

\*: El estándar 5 de proteína de leche y de huevo y el estándar 6 de gluten fueron los puntos sobre los que se normalizó el resto de puntos de la curva, por lo que su B/BMAX siempre resultó del 100%.

-: No determinado (los kits de proteína de leche y de huevo no incluyen estándar 6).

DE: Desviación estándar. STD: Estándar.

### 5.2.2.2 Estudio de la exactitud

En el 74,2% de las matrices fortificadas, se cumplió el criterio de aceptación de recuperación establecido en un intervalo del 70-130% para la leche y huevo, y del 80-120% para el gluten. Evaluando por tipo de ensayos, para la detección de la proteína de leche el criterio de exactitud se cumplió en el 50% de las 14 determinaciones, y en la determinación de proteína de huevo se cumplió en los 8 ensayos (100%). El criterio de recuperación de gluten fue satisfactorio en el 88,88% de los 9 ensayos ejecutados. En la Tabla 72 se presenta la media de cantidad cuantificada de cada MR para cada tipo de ensayo y el correspondiente porcentaje de recuperación medio y porcentaje de cumplimiento del criterio de aceptación (%).

**Tabla 72.** Cantidad (mg/kg), porcentaje de recuperación y cumplimiento del criterio de exactitud de cada ensayo según el material de referencia empleado.

Analito	Material de referencia (n)	$\bar{x}$ mg/kg	$\bar{x}$ recuperación % (DE)	Cumplimiento criterio n (%)
Proteína Leche	MoniQA Low (5)	14,21	444,19 (538,78)	2 (40)
	MoniQA High (5)	19,31	132,29 (61,38)	1 (20)
	FAPAS 27204AQC (2)	44,66	82,26 (7,17)	2 (100)
	FAPAS TYG001 (2)	21,64	75,66 (0,49)	2 (100)
Proteína Huevo	FAPAS 27204AQC (2)	28,06	89,66 (12,27)	2 (100)
	FAPAS TYG001 (3)	79,66	95,41 (28,94)	3 (100)
	FAPAS TYG002 (3)	26,58	96,67 (26,49)	3 (100)
Gluten	FAPAS 27204AQC (1)	34,71	144,63 (-)	0 (0)
	FAPAS TYG001 (3)	14,24	98,91 (12,90)	3 (100)
	FAPAS TYG002 (3)	29,12	103,27 (5,12)	3 (100)
	IC 327(2)	29,41	104,29 (5,82)	2 (100)

DE: Desviación estándar.

En la determinación de proteína de leche, los porcentajes de recuperación con las 2 muestras control de MoniQA Low que cumplieron los criterios de aceptación fueron del 81,25% y 87,5%, mientras que las muestras que incumplieron se obtuvieron unas concentraciones muy elevadas: 6,94 mg/kg, 15,89 mg/kg y 43,44 mg/kg (216,88%, 496,56% y 1357,50% de recuperación, respectivamente) respecto al valor esperado asignado por el fabricante (3,20 mg/kg  $\pm$  1,76). Con el MoniQA High solo un valor estuvo comprendido dentro del criterio de aceptación del 30%, presentando un porcentaje de recuperación del 78,49%. Los porcentajes de recuperación que superaron el criterio de aceptación con el MoniQA High fueron 68,63%, 146,85%, 147,53% y 219,93%.

Respecto a los MR de la casa FAPAS, la media de recuperación que se obtuvo con las 5 muestras de 27204AQC utilizado para la detección de las

tres sustancias fue del 85,96%. El MR TYG001 se empleó en el estudio de la exactitud del método de las tres sustancias siendo satisfactorias el 100% con una media de recuperación del 91,79%. Con las 6 muestras del MR TYG002 que se emplearon en la determinación de huevo y gluten se cumplió el criterio de exactitud establecido con una media de recuperación del 99,97%.

Por último, las dos veces que se empleó el sobrante del ensayo de intercomparación de gluten se consiguió cumplir el criterio del 80-120% con una media de recuperación del 104,29%.

### 5.2.2.3 Estudio de la precisión

De los 236 valores evaluados por duplicado de pocillo entre estándares, muestras control y muestras problemas, el 86,9% cumplieron el criterio de aceptación para evaluar la precisión (CV <15%). El porcentaje medio del CV fue del 8,24%.

El CV se mantuvo dentro del 15% permitido para duplicado de pocillo en todos los estándares excepto en un estándar 1 del ensayo de gluten (CV 17,18%), lo que supone un 98,3% de cumplimiento. La media de CV de las 58 determinaciones de los estándares fue de 2,86%. En la Tabla 73 se muestra el porcentaje medio del CV ajustado por tipo de ensayo y estándar.

**Tabla 73.** Media de coeficiente de variación según el tipo de ensayo y estándar.

Analito (n.º ensayos)	STD 1 $\bar{x}$ (DE)	STD 2 $\bar{x}$ (DE)	STD 3 $\bar{x}$ (DE)	STD 4 $\bar{x}$ (DE)	STD 5 $\bar{x}$ (DE)	STD 6 $\bar{x}$ (DE)
Proteína leche (5)	5,76 (3,35)	2,26 (1,07)	3,50 (2,49)	3,69 (3,10)	2,09 (0,86)	-
Proteína huevo (3)	1,50 (0,56)	3,72 (1,56)	1,87 (1,59)	1,57 (1,28)	3,76 (0,79)	-
Gluten (3)	9,23 (7,15)	0,61 (0,26)	0,91 (0,66)	1,93 (2,24)	0,72 (0,93)	0,56 (0,56)

-: No determinado (el kit de proteína de leche y de huevo no tienen estándar 6).

STD: Estándar. DE: Desviación estándar.

En las muestras control, el criterio de aceptación se cumplió en el 90,3% de los materiales utilizados, superando el límite el MR MoniQA Low en 2 ocasiones (20,73% y 23,78%) y el MoniQA High en 1 determinación (18,87%), aunque sus medias de CV fueron aceptables como se puede observar en la Tabla 74. El porcentaje medio del CV de las 31 determinaciones de las muestras control fue del 5,60%. En la Tabla 74 se muestra el porcentaje medio del CV ajustado por tipo de ensayo y material de referencia.

**Tabla 74.** Media de coeficiente de variación según el tipo de ensayo y material de referencia.

Analito	Low $\bar{x}$ (DE)	High $\bar{x}$ (DE)	27204AQC $\bar{x}$ (DE)	TYG001 $\bar{x}$ (DE)	TYG002 $\bar{x}$ (DE)	IC 327 $\bar{x}$ (DE)
Proteína leche	13,30 (8,96)	8,83 (7,24)	1,63 (0,52)	5,80 (7,63)	-	-
Proteína huevo	-	-	3,13 (2,34)	2,32 (2,99)	3,36 (2,17)	-
Gluten	-	-	6,66 (-)	2,34 (1,13)	1,14 (0,77)	3,90 (4,02)

-: No se emplearon esos MR para ese tipo de ensayo.

DE: Desviación estándar.

En las 147 determinaciones de las muestras problema, el criterio del CV establecido para duplicado de pocillo, se cumplió en 112 de las muestras analizadas (82,4%). El porcentaje medio del CV fue del 10,56%.

### 5.3 DISCUSIÓN

Las reacciones de hipersensibilidad alimentarias son un problema de salud pública emergente que afecta a la calidad de vida de quien las sufre, observándose un aumento de los casos en las últimas décadas.

Evitar ingerir el alérgeno alimentario es la prevención y tratamiento más eficaz que existe, por lo que regulaciones recientes han mejorado la información del etiquetado disponible para el consumidor sobre los ingredientes alergénicos que se añaden voluntariamente en los alimentos, siendo obligatoria también su declaración en los alimentos dirigidos a las colectividades.

Sin embargo, la industria alimentaria y el control oficial se enfrentan al reto de detectar la presencia oculta de sustancias que causan alergias o hipersensibilidades no alérgicas alimentarias. Si bien la presencia oculta de alérgenos se puede deber a la no declaración o a una adulteración fraudulenta, también se puede deber, a pesar de que se realicen unas buenas prácticas de manipulación, al contacto cruzado. Este hecho podría ocurrir en los menús especiales servidos en los CEI del Ministerio de Defensa y fue el motivo por el que se realizó por primera vez una campaña de control oficial de detección de alérgenos durante el año 2018.

Para ello, son necesarios métodos analíticos fiables para la detección y cuantificación de alérgenos. Los métodos por enzoinmunoensayo tipo ELISA y los métodos basados en técnicas genéticas PCR son los más utilizados en los análisis de rutina, mientras que el resto solo son aplicables en el campo de la investigación.

En nuestro trabajo hemos empleado el método ELISA por ser considerado por el CNA y los laboratorios de control oficial como el método de referencia. A continuación, se discuten los resultados obtenidos.

### 5.3.1 Detección y cuantificación de proteína de leche, proteína de huevo y de gluten en los menús especiales

La presencia de resultados positivos en las muestras analizadas de los menús especiales sin leche, sin huevo y libre de gluten fue baja (1,50%), detectándose una muestra positiva en los menús sin leche y otra positiva en las muestras de los platos libres de gluten, por lo que se considera que el nivel de seguridad alimentaria es alto.

En nuestro estudio, la muestra positiva de gluten superó el umbral superior de detección de 100 mg/kg. Como se ha recogido anteriormente, la declaración sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos y sus condiciones se encuentra regulada por el Reglamento de Ejecución (UE) n.º 828/2014. Así, la declaración “sin gluten” solo podrá utilizarse cuando los alimentos, tal como se venden al consumidor final, no contengan más de 20 mg/kg de gluten, mientras que la declaración “muy bajo en gluten” solo podrá utilizarse cuando los alimentos que consistan en trigo, centeno, cebada, avena o sus variedades híbridas, o que contengan uno o más ingredientes hechos a partir de estos cereales, que se hayan procesado específicamente para reducir su contenido de gluten, no contengan más de 100 mg/kg en el alimento tal como se vende al consumidor final.

Para la proteína de leche y de huevo no hay unos límites de concentración establecidos como para el gluten, sino que se regula su presencia mediante la normativa de etiquetado (Reglamento (UE) nº 1169/2011; Reglamento Delegado (UE) nº 78/2014).

La declaración de dos muestras positivas se debe, presumiblemente, a un contacto cruzado durante la preparación y/o manipulación de los menús. En los CEI del Ministerio de Defensa que tenían cocina propia se trabajaba con separación en el tiempo, es decir, se elaboraban primero los menús especiales. En la cocina central de *catering* tampoco tenían una línea exclusiva, por lo que la elaboración de los menús especiales se realizaba en un turno de noche y en otro de tarde. En estas dos tandas, tras una limpieza y desinfección previa de las instalaciones, se incorporaban manipuladores de alimentos específicos para la elaboración de los menús especiales, con ropa exclusiva y vestuarios independientes. Asimismo, los proveedores y almacenamiento de materias primas y platos elaborados eran propios para los menús especiales. Por último, el transporte a los comedores escolares también se realizaba en vehículos diferentes. Una vez llegaban los menús especiales a los CEI del Ministerio de Defensa, las buenas prácticas de manipulación eran responsabilidad de los manipuladores de la empresa adjudicataria. La conservación de los menús especiales se realizaba separadamente y la regeneración y servicio de los mismos se llevó a cabo antes que la del resto de menús.

El presente trabajo se trata de uno de los primeros estudios que arroja resultados de control de alérgenos en menús especiales en España, y a nivel internacional. Uno de los pocos estudios previos es el que realizó Petruzzelli

*et al.* (2014), en el que analizaron 36 muestras libres de lactosa y 87 muestras libres de gluten en dietas especiales. Para el análisis de gluten utilizaron el Kit ELISA RIDASCREEN® Gliadin y detectaron un 1,2% de muestras positivas. Estos autores consideraron el fenómeno de contacto cruzado como posible causa de los positivos detectados.

En otro estudio, realizado en 50 colegios, se investigó la presencia de los tres principales alérgenos (leche, huevo y gluten) en las superficies de las cocinas de áreas de uso general y también en las superficies de zonas de uso exclusivo para menús especiales. Estas superficies se analizaron inicialmente *in situ* con tiras LFD y, posteriormente, se envió el sobrante del extracto de las muestras a un laboratorio para el análisis confirmatorio mediante ELISA. Los resultados con el test rápido (LFD) fueron negativos para la presencia de leche. Sí se detectaron proteína de huevo y gluten en el 15% y 45% de las muestras, respectivamente. Los resultados obtenidos con el ELISA presentaron una baja prevalencia para la leche (6%) y mayor para huevo (24%) y gluten (57%). Es importante recalcar que encontraron valores por encima del 40% en superficies de zonas específicas para menús especiales. Estos hallazgos revelan que los procedimientos de limpieza no fueron los más apropiados para el control del riesgo de alérgenos ocultos, incluso que el contacto cruzado puede estar presente en los menús libres de alérgenos preparados en las zonas específicas para ello (Ortiz *et al.*, 2018).

En el campo de los alérgenos es más apropiado hablar de contacto cruzado que de contaminación cruzada. El primer concepto se refiere al contacto accidental entre comidas alergénicas y no alergénicas, es decir, se mezclan las proteínas de diferentes alimentos. Sin embargo, en la contaminación cruzada el contacto es entre productos crudos y cocinados, relacionándose con la contaminación microbiana y controlándose en muchas ocasiones con un tratamiento térmico, algo que no ocurre con los alérgenos (Lessa *et al.*, 2016). En este trabajo de Lessa *et al.* (2016) realizado sobre el conocimiento, actitudes y prácticas relacionadas con la alergia alimentaria se obtuvieron resultados alarmantes. Por ejemplo, el 46,35% de los profesionales de hostelería encuestados no leían las etiquetas de los alimentos, el 57,3% no creía que la limpieza fuera efectiva para la eliminación de alérgenos o el 25,6% pensaba que retirando el alimento causante de una alergia de un plato elaborado se prevenía la reacción alérgica. Estos resultados revelan que la formación de manipuladores de alimentos específica sobre alérgenos alimentarios es necesaria y esencial.

### 5.3.2 Control de calidad de las metodologías de análisis

Disponer de métodos analíticos exactos y precisos así como de MR homogéneos y estables es esencial para conseguir la fiabilidad y comparabilidad de los resultados en la detección y cuantificación de alérgenos.

Entre las generalidades que recoge la Norma ISO 15842:2020, deben observarse los requisitos generales de garantía de la calidad de los laboratorios

como, por ejemplo, la determinación por duplicado, la inclusión de blancos, el uso de materiales de referencia y la preparación de curvas de calibración (AENOR, 2020).

Por ello, con los criterios establecidos por el CNA y los laboratorios de control oficial se pretende armonizar los métodos analíticos usados por los laboratorios en sus análisis de rutina.

Es importante mencionar que hay pocos estudios que hayan realizado un control de calidad de las metodologías analíticas de alérgenos y gluten y sobre criterios de aceptación de los resultados, por lo que nuestros resultados se han comparado con escasos datos de otras investigaciones.

### **5.3.2.1 Comprobación de la curva de calibrado**

El criterio de aceptación de la curva de calibrado de normalización B/B<sub>max</sub> del 30% respecto a los resultados B/B<sub>max</sub> del certificado de calidad del kit, se cumplió en más del 90% de los puntos (estándares) de la curva evaluados.

Todos los estándares de los kits RIDASCREEN® FAST Ei/EggProtein y RIDASCREEN® Gliadin R7001 para el análisis de proteína de huevo y gluten, respectivamente, cumplieron con el criterio.

Los porcentajes medios de B/B<sub>max</sub> del test RIDASCREEN® FAST Milk también fueron aceptables, aunque este kit es el que obtuvo los únicos incumplimientos. Tres de los incumplimientos se correspondieron a un mismo ensayo afectando a los estándares 1, 2 y 3 con valores muy superiores a los del criterio de tolerancia (337,06; 225,08; y 156,48, respectivamente), por lo que se podría deber a un contacto cruzado, error del analista o alteración del kit. En este caso se invalidó el ensayo y se procedió a su repetición. Los otros dos incumplimientos se dieron en dos estándares 1 que superaron ligeramente el 30% de tolerancia (69,06% y 131,30%) y como el resto de puntos sí cumplían el criterio de aceptación se consideró válido el ensayo. En el kit para el análisis de proteína de huevo y de gliadina, el estándar 1 fue el que presentó también una mayor dispersión, pero siempre dentro del rango del criterio de aceptación.

En términos generales, se puede afirmar que el comportamiento de la curva respecto a este criterio fue satisfactorio.

### **5.3.1.2 Estudio de la exactitud**

El criterio de exactitud se cumplió prácticamente en el 75% de las matrices fortificadas. Los peores valores de recuperación se dieron en la determinación de proteína de leche, específicamente cuando se emplearon los MR MoniQA.

En la validación del test RIDASCREEN® FAST Milk realizada por Weiss *et al.* (2016), utilizaron como calibradores los MR MoniQA y evaluaron el efecto matriz en 5 diferentes matrices que fueron fortificadas con 0; 5; 10 y 30 mg/kg

de proteína de leche. La media de recuperación fue del 105%. Los altísimos porcentajes de recuperación obtenidos en nuestros resultados no aceptables con los MR MoniQA Low (incumplimiento del 60%), provocaron que la media de recuperación fuera del 444,19%. Con el MoniQA High también se sobrepasó el límite acordado del 30% (132,29%), con un incumplimiento del 80%. Los porcentajes medios de recuperación al usar los MR de FAPAS para la determinación de proteína de leche, presentaron unos resultados satisfactorios (TYG001 75,66% y 27204AQC 82,26%) y con ellos se cumplió el criterio de exactitud en el 100% de los ensayos.

En la validación de Weiss *et al.* (2016) del kit RIDASCREEN® FAST Milk, todas las muestras blancas se detectaron por debajo del límite de cuantificación (<2,5 mg/kg). En los 5 ensayos que utilizamos como control negativo MoniQA Blank, solo en una ocasión se detectó por encima del límite de cuantificación, con un valor de 4,2 mg/kg.

En otro estudio, evaluaron el efecto del procesado en la recuperación y variabilidad en una sola matriz (masa de galleta), a la que le adicionaron antes de ser procesada harina de cacahuete desgrasada, huevo entero en polvo (NIST RM 8445) y leche en polvo (NIST RM 1549) a 7 concentraciones diferentes (0; 2,5; 5; 10; 25; 100 y 500 mg/kg). Entre los 5 kits comerciales que utilizaron se encontraba el RIDASCREEN® FAST Casein y el RIDASCREEN® β-lactoglobulin. El primero obtuvo una media de recuperación en todos los niveles procesados aceptable (117,7%), pero infraestimó el contenido de caseína en los tres niveles fortificados más bajos, mientras que en los más altos sobreestimó la concentración de caseína. El segundo Kit del fabricante R-Biopharm, solo detectó lactoglobulina en los niveles más altos, y aún así la recuperación fue muy baja (18,7%), por lo que el kit no fue capaz de detectar el límite de cuantificación indicado por el fabricante en la matriz de masa de galleta. Estos autores, utilizando como control muestras adicionadas, concluyeron que el procesado térmico afecta negativamente a la exactitud y precisión de la detección de alérgenos (Khuda *et al.*, 2012).

En nuestro estudio, podemos observar en la Tabla 72 cómo el kit para el análisis de proteína de huevo cumplió con el criterio de aceptación, con unos porcentajes medios de recuperación satisfactorios de los 3 materiales de referencia de FAPAS empleados.

Khuda *et al.* (2012), sobreestimaron los niveles proteína de huevo añadidos a la masa de galleta procesada con el kit RIDASCREEN® FAST Ei/Egg Protein, con una media de recuperación del 299%.

La Agencia de Inspección de Alimentos Canadiense evaluó y validó la detección de proteína de huevo a través de un estudio interlaboratorial. Cada laboratorio recibió muestras de helado, pan y pasta libres de proteína de huevo, comercializadas con un contenido de proteína conocido o fortificadas con 1,7; 6,7 y 18,7 mg/kg de proteína de huevo. Se utilizaron 5 kits comerciales ELISA, entre los que se encontraba RIDASCREEN® FAST Ei/Egg Protein. Las me-

días de recuperación para cada uno de los alimentos fueron del 99%, 101% y 107%, respectivamente, y con una precisión entre 5,1 y 12,4% (Marceau *et al.*, 2012). Estos resultados de porcentaje de recuperación con muestras fortificadas se asemejan más a los de nuestro trabajo, que los obtenidos en muestras adicionadas por Khuda *et al.* (2012).

En el caso del gluten, el criterio de aceptación de una recuperación del 20% se cumplió con los MR de FAPAS TYG001 y TYG002, pero la única vez que se utilizó el 27204AQC excedió el umbral permitido (144,63%). La exactitud fue satisfactoria tras los dos análisis con material sobrante de intercomparación IC 327 con una recuperación media del 104,29%.

En el estudio comparativo de Lexhaller *et al.* (2016), analizaron las fracciones de prolamina y glutelina del trigo, cebada y centeno con 5 ELISA sándwich con un anticuerpo diferente cada uno. El MR utilizado fue el PWG-gliadin. El contenido de gluten que el anticuerpo R5 del kit RIDASCREEN® Gliadin recuperó fue del 140% para el trigo, 630% para el centeno y 820% para la cebada.

Como se puede constatar con nuestros resultados, y siempre con la reserva derivada del limitado número de veces que se ha evaluado la recuperación, el rendimiento de los kits varía mucho. El kit RIDASCREEN® FAST Milk, presentó unos resultados de exactitud no satisfactorios cuando se evaluó la recuperación con los MR MoniQA, mientras que con los MR FAPAS se comportó de manera aceptable. La utilización de los sobrantes de intercomparación como MR para la evaluación de la exactitud puede ser una opción más, aunque la estabilidad de los mismos no está garantizada. De todas maneras, consideramos necesarios más estudios de recuperación con los MR y sobrantes de intercomparación, para poder evaluar el criterio de determinación de la exactitud propuesto por el CNA y los laboratorios de control oficial.

En nuestro estudio no utilizamos muestras adicionadas, aunque se puede apreciar en los resultados de otros estudios que también hay una gran variabilidad en los resultados. Las muestras adicionadas permiten el desarrollo y validación de métodos analíticos y evaluación de MR. En una reciente revisión, Mattarozzi y Careri (2019), consideran que el uso de muestras adicionadas como MR permite simular el efecto del procesado en la estructura del analito alergénico, y de esta manera, mejorar la fiabilidad de los métodos de detección de alérgenos.

### **5.3.1.3 Estudio de la precisión**

El criterio para la evaluación de la precisión, del 15% de CV entre duplicado de pocillo, se cumplió en el 86,9% de las muestras evaluadas (estándares, muestras control y muestras problemas), con una media de CV del 8,24%.

La Norma ISO 15842:2020 establece que para análisis cuantitativos hay que evaluar el CV de los patrones (estándares), el CV de las muestras control y el CV entre las réplicas (muestras problema) (AENOR, 2020).

Para el duplicado de estándares, el porcentaje medio total del CV fue prácticamente del 100%. Sólo un estándar 1 en el ensayo de leche sobrepasó el 15% permitido.

Como ya se ha reflejado en el apartado de resultados, los valores no aceptables en los MR se correspondieron a duplicados de MoniQA Low y MoniQA High, utilizados en la detección de proteína de leche. Los resultados de precisión para el análisis de proteína de huevo fueron satisfactorios y para el gluten también obtuvimos unas buenas medias de CV con los MR y el sobrante de intercomparación (FAPAS TYG001 2,34%, FAPAS TYG002 1,14% e IC 327 3,90%) y un CV del 6,66% para la única muestra de FAPAS 27204QC empleada en la detección de gliadina. En el estudio de Lexhaller *et al.* (2016), obtuvieron una media de CV en el PWG-gliadin del 6,0% para el R5 ELISA (RIDASCREEN® Gliadin). Para los otros 4 kits comerciales las medias de CV fueron de 8,8%, 9,2%, 4,7% y 6,1% (n=4 en cada kit). En los casos en los que no existe MRC, como puede ser en la detección de alérgenos en alimentos, consideramos que las medidas por duplicado son esenciales para el control de la calidad del método analítico y detectar errores sistemáticos.

El menor grado de concordancia entre las réplicas tuvo lugar entre las muestras problema, con una aceptación del 82,4% y una precisión del 10,56%.

Resumiendo nuestros resultados relativos a la evaluación de estos criterios de aceptación establecidos por el CNA y laboratorios de control oficial, los podemos considerar aceptables. Sin embargo, el comportamiento del kit RIDASCREEN® FAST Milk ha resultado ser el menos estable y con peor exactitud, al igual que el comportamiento de los MR MoniQA.

Los Kits ELISA han sido criticados en ocasiones por sus resultados inestables. En el estudio de Lacorn *et al.* (2018) se realiza una exposición de lecciones aprendidas de casos prácticos que repasan aspectos como las interferencias, reactividad cruzada, materiales de referencia, influencias de la matriz, fragmentación de alérgenos y gluten y el malinterpretado uso previsto del método. Estos autores también exponen aspectos a considerar sobre los principales parámetros a la hora de realizar la validación de un método de ELISA, como son el límite de cuantificación y el límite de detección, sin dejar de lado otros considerandos sobre el efecto matriz e interferencia, sobre los errores sistemáticos y aleatorios para el cálculo de la incertidumbre y su relación con la no disponibilidad de materiales de referencia certificados.

El CNA, en consenso con los laboratorios de control oficial, también acordó unos criterios para la validación del método:

- Selección de matrices: mínimo cinco grupos distintos de matrices, considerando dentro de cada grupo alimentos distintos.
- Límites de detección/cuantificación: el valor del estándar de menor concentración, que en la mayoría de los casos coincide con el límite de cuantificación declarado por el fabricante. Tanto el límite de detección y de

cuantificación se deben comprobar en cuanto a precisión y exactitud sobre matriz.

- Precisión: en condiciones de reproducibilidad intermedia, al menos tres repeticiones para cada una de las matrices. Como criterio de aceptación se estableció una variación máxima del 25% (RSR >25%).
- Exactitud: mediante el porcentaje de recuperación (80-120% para los ensayos de gluten y el 70-130% para los ensayos del resto de alérgenos).
- Niveles de rango de trabajo: el método debe estar controlado en cuanto a precisión y exactitud en al menos tres niveles de rango de trabajo (bajo, medio y alto).

Estas recomendaciones y criterios a la hora de plantearse la validación de un método de detección de alérgenos, se acaban de ver reforzadas con la publicación de la Norma UNE-EN ISO 15842:2020.

Las reacciones de hipersensibilidad alimentaria son un tema de creciente preocupación en la inocuidad alimentaria a nivel mundial y en la UE. Así lo demuestra la iniciativa de la CE de modificar el Reglamento (CE) n.º 852/2004 para incluir nuevos requisitos de seguridad alimentaria relacionados con la prevención de la presencia de alérgenos en la cadena alimentaria, alineándose con el nuevo Código de prácticas sobre gestión de alérgenos alimentarios del *Codex Alimentarius* que será adoptado próximamente.

Todas estas novedades e información nos serán de gran utilidad en los ensayos rutinarios con los Kits de ELISA para la detección de alérgenos y de gluten y debe alentarnos para validar nuestro método. No solo para seguir controlando los principales alérgenos en los CEI del Ministerio de Defensa, sino también para el control del gluten en otras instalaciones alimentarias militares como los centros docentes militares de formación y en los menús de las raciones individuales de combate, máxime desde que la celiaquía ha quedado fuera del cuadro de exclusiones médicas para el ingreso en las Fuerzas Armadas.



## **CAPÍTULO VI**

---

# **CONTRIBUCIÓN A LA EVALUACIÓN DEL RIESGO Y PROPUESTA DE MEDIDAS PARA LA MEJORA DE LA GESTIÓN DEL RIESGO**



## CAPÍTULO VI. CONTRIBUCIÓN A LA EVALUACIÓN DEL RIESGO Y PROPUESTA DE MEDIDAS PARA LA MEJORA DE LA GESTIÓN DEL RIESGO

El objetivo general de la seguridad alimentaria es proveer de alimentos inocuos que no provoquen daños a la salud de las personas. El enfoque para garantizar la inocuidad alimentaria se basa, entre otros principios y medidas, en el **análisis del riesgo** y la **corresponsabilidad de la cadena alimentaria**.

El Reglamento (CE) n.º 178/2002 establece el **análisis del riesgo** como la base de la legislación alimentaria y lo define como un proceso formado por tres elementos interrelacionados: determinación del riesgo, gestión del riesgo y comunicación del riesgo. La determinación o evaluación del riesgo, es un proceso con fundamento científico formado por cuatro etapas: identificación del factor de peligro, caracterización del factor de peligro, determinación de la exposición y caracterización del riesgo.

La determinación de la exposición evalúa cualitativa y/o cuantitativamente la ingestión probable de peligros biológicos, químicos y físicos a través de los alimentos, y de las exposiciones que derivan de otras fuentes, si fueran pertinentes. Incluye niveles de exposición que existen o podrían existir (según los hábitos de consumo y los niveles de contaminación), y considera grupos de población vulnerables o expuestos a alto riesgo.

Por otro lado, el Reglamento (CE) n.º 178/2002 asigna **responsabilidades** en materia de seguridad alimentaria a los explotadores de empresas alimentarias y a los EE.MM. Los primeros deben asegurar en todas las etapas de la cadena alimentaria que los alimentos cumplen los requisitos de la legislación alimentaria y verificar que se cumplen dichos requisitos, mediante sistemas de autocontrol basados en el análisis de APPCC. Por su parte, los EE. MM. deben velar por el cumplimiento de la legislación alimentaria, y controlar y verificar que los explotadores de empresas alimentarias cumplen los requisitos pertinentes de la legislación alimentaria en todas las etapas de la cadena alimentaria.

En el contexto de esta Tesis Doctoral, esta responsabilidad compartida se reparte entre la empresa adjudicataria del servicio de alimentación de los CEI, que tiene establecido un sistema de autocontrol APPCC en todos los CEI del Ministerio de Defensa, y la IGESANDEF, como autoridad sanitaria responsable del control oficial.

La IGESANDEF, a través de las Direcciones de Sanidad de los Ejércitos y Armada, como parte del control oficial, elabora un programa anual de inspecciones siguiendo las directrices de la Instrucción Técnica Sanitaria 01/2014, que regula y normaliza el procedimiento de las inspecciones de seguridad alimentaria en las instalaciones alimentarias militares, incluidas las cocinas-co-

medores de los CEI. Estas instalaciones están categorizadas en base a una evaluación de los riesgos sanitarios realizada por parte de los oficiales veterinarios inspectores que, en función de la puntuación obtenida, determina la frecuencia de inspección. Todos los CEI pertenecen a la categoría A, lo que supone realizar, al menos, 3 inspecciones anuales, en el desarrollo de las cuales se pueden tomar muestras de alimentos de carácter informativo, probatorio o en cumplimiento de una campaña oficial como la que se llevó a cabo durante el año 2017. La IGESANDEF planifica todos los años una campaña de control oficial en alimentos y otras actividades de control de vigilancia y seguimiento que ejecutan los oficiales veterinarios como agentes de la autoridad sanitaria, con el fin de comprobar que los operadores de las empresas alimentarias observan las normas de higiene y seguridad alimentaria. Este sistema de actuaciones de control oficial en el Ministerio de Defensa es equivalente al Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria que realizan otras Administraciones públicas españolas en el ámbito de sus competencias. El CEMILVETDEF, a través del Laboratorio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública, es el encargado de realizar los análisis de las muestras tomadas en las campañas de control oficial y vigilancia.

Estos dos aspectos, la implantación de un sistema de autocontrol en cada CEI y el control oficial al que se ven sometidos, aportan un alto grado de seguridad alimentaria, como revelan los resultados obtenidos en el presente estudio. Los resultados de esta Tesis Doctoral permiten, en este marco del análisis del riesgo, contribuir a evaluar la exposición de un grupo de población vulnerable, como son los niños de 0-3 años, a algunos de los riesgos que pueden vehicular los menús servidos en los comedores de los CEI del Ministerio de Defensa, en concreto, de patógenos (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Cronobacter* spp.) y otros microorganismos y de sustancias que provocan reacciones de hipersensibilidad (gluten, proteína de leche y de huevo). Además, también evalúa posibles desequilibrios nutricionales.

Tras evaluar en los capítulos precedentes la exposición a los riesgos objeto de esta Tesis y analizar los factores y circunstancias que han podido contribuir a ellos, en este capítulo se proponen una serie de medidas que podrían ser implementadas como parte del sistema de autocontrol de los CEI así como del control oficial para mejorar la gestión de dichos riesgos.

## **6.1 PROPUESTA DE MEDIDAS PARA LA MEJORA DE LA GESTIÓN DE RIESGOS MICROBIOLÓGICOS**

Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos han permitido verificar la eficacia del sistema de autocontrol implantado por la empresa adjudicataria. No obstante, teniendo en cuenta que los menús van dirigidos a población de riesgo (lactantes y niños de corta edad), la detección de *Cronobacter* spp. en una muestra, así como la existencia de muestras no aceptables en relación a los indicadores de higiene del proceso, aunque con baja prevalencia, nos lleva a proponer las siguientes medidas de mejora, con el fin de que puedan ser de utilidad tanto para el autocontrol como para el control oficial.

### 6.1.1 Medidas propuestas para el operador de la empresa (autocontrol):

1. Revisar el tratamiento térmico aplicado y mantenimiento post-elaboración de los platos calientes, en especial de los purés de los menús de iniciación y verificar su eficacia.
2. Revisar los procedimientos de higienización de hortalizas y frutas y verificar su eficacia.
3. Incluir en la verificación del plan de limpieza y desinfección la toma de muestras de superficies para detectar la posible presencia de bacterias que forman *biofilms* (*L. monocytogenes* y *Cronobacter* spp.)
4. Realizar cursos de formación continuada para manipuladores transmitiendo los resultados de esta Tesis Doctoral y haciendo hincapié en los puntos anteriores.

### 6.1.2 Medidas propuestas para el control oficial:

1. Diseñar una campaña de control oficial específica para ingredientes de ensaladas, incluyendo el análisis de patógenos formadores de esporas (BC y CSR), en consonancia con estudios de otros grupos de investigadores (Osimani *et al.*, 2015; Petruzzelli *et al.*, 2018; Bogdanovičová *et al.*, 2019; Soares *et al.*, 2020a), y para los que se dispone de técnicas analíticas validadas en el Laboratorio de Seguridad Alimentaria y Salud Pública del CEMILVETDEF.
2. En el caso de obtener recuentos positivos de EC, investigar la posible presencia de STEC mediante PCR en tiempo real en base a la Norma ISO 13136:2012.
3. Valorar la toma de muestras de superficies durante las inspecciones de control oficial para detectar la posible presencia de bacterias que forman *biofilms* (*L. monocytogenes* y *Cronobacter* spp.).
4. Validar la técnica analítica de *Cronobacter* spp. para un mayor aseguramiento de la calidad de los resultados.

## 6.2 PROPUESTA DE MEDIDAS PARA LA MEJORA DE LA GESTIÓN DE RIESGOS NUTRICIONALES

Puesto que el menú escolar es fundamental para cubrir parte de las necesidades diarias de energía y nutrientes y, teniendo presente que se debe complementar con el resto de comidas consumidas en el hogar familiar, la evaluación de los riesgos nutricionales permite la adecuación de la dieta para un correcto crecimiento y desarrollo de la población infantil.

Los resultados obtenidos muestran un margen de mejora en la gestión de estos riesgos en algunos de los menús, que permitan un ajuste energético, de los perfiles calóricos y lipídicos y de la ingesta de micronutrientes. Por ello, se

proponen las siguientes medidas de mejora de la gestión de los riesgos nutricionales en los menús servidos en los CEI del Ministerio de Defensa:

### **6.2.1 Medidas propuestas para el operador de la empresa (autocontrol):**

1. Sustituir los postres a base de yogures por purés de fruta, en los menús de iniciación de GC.
2. Incrementar el número de raciones de arroz, ensaladas y frutas, y disminuir la presencia de carne en beneficio de pescado y huevos, como primera intervención para ajustar el perfil calórico y otros desajustes detectados (calidad de la grasa y micronutrientes), en los menús completos de GC.
3. Mejorar la variedad en las recetas, en los menús completos de GD tanto en los primeros platos como en los segundos platos.
4. Mejorar la rotación de pescados en general, e introducir raciones de pescado azul, tanto en los menús de GD como en los de GC.

### **6.2.2 Medidas propuestas para el control oficial**

1. Elaborar un programa de intervención que asesore y modifique las planillas de los menús durante un curso escolar, en base a las propuestas anteriores y a los resultados del presente estudio.
2. Realizar una evaluación nutricional y dietética de los menús libres de gluten y otros menús especiales (sin leche, sin lactosa, sin huevo, etc.).
3. Diseñar un cuestionario para evaluar la calidad nutricional y de la dieta de los menús de los CEI del Ministerio de Defensa (incluyendo subcategorías para algunos grupos de alimentos y basado en ítems cuantificables y escalas de equilibrio).

## **6.3 PROPUESTA DE MEDIDAS PARA LA MEJORA DE LA GESTIÓN DE RIESGOS DE SUSTANCIAS QUE CAUSAN HIPERSENSIBILIDAD ALIMENTARIA**

Una correcta evaluación del riesgo de alérgenos es esencial para que las empresas alimentarias gestionen este peligro. El control en el sector de la restauración colectiva se centra en la información al consumidor y la prevención del contacto cruzado. Por ello, incluir un plan de control de alérgenos como parte esencial del sistema de autocontrol minimiza el riesgo asociado a la presencia de estas sustancias en los alimentos.

En los CEI del Ministerio de Defensa se elaboran menús especiales para las diferentes reacciones de hipersensibilidad que padecen los niños. En las planillas de los menús y sus correspondientes fichas técnicas se detallan los ingredientes entre los que se excluyen las sustancias causantes de la hipersensibilidad.

sibilidad alimentaria. Un plan analítico adecuado de estos menús especiales ayuda al control del riesgo de estas sustancias no deseables en los alimentos. Para ello, son necesarias metodologías analíticas fiables y validadas.

La detección de solo dos muestras positivas (gluten y proteína de leche) podría indicar una gestión eficaz de estos riesgos. No obstante, hay que tener en cuenta que, además de la edad de los niños a los que van dirigidos los menús especiales, hay añadir el factor de riesgo de la hipersensibilidad que padecen. Por ello, se hace necesario implementar medidas que contribuyan a reducir el riesgo en la mayor medida posible.

#### **6.3.1 Medidas propuestas para el operador de la empresa (autocontrol):**

1. Revisar y mejorar el plan de limpieza y desinfección de superficies, incluyendo la toma de muestras con tiras LFD.
2. Aumentar la frecuencia de los cursos de formación continuada de los manipuladores, así como el contenido dedicado al control de sustancias causantes de reacciones de hipersensibilidad alimentaria, haciendo especial hincapié en las medidas preventivas para evitar el contacto cruzado.

#### **6.3.2 Medidas propuestas para el control oficial:**

1. Mejorar la metodología analítica identificando previamente sus puntos débiles (interferencias, reactividad cruzada, efecto matriz, rendimiento de los materiales de referencia).
2. Validar del método mediante ELISA de determinación de gluten, proteína de leche y proteína de huevo.
3. Participar en más ensayos de intercomparación.
4. Verificar *in situ* el cumplimiento de lo recogido en el plan de control de alérgenos.



## CONCLUSIONES

---



## CONCLUSIONES

En base a nuestros resultados, presentados en esta Tesis Doctoral, hemos establecido las siguientes conclusiones:

- PRIMERA Bajo el punto de vista microbiológico, el análisis de microorganismos patógenos y de indicadores sobre las muestras analizadas evidenció un alto grado de seguridad alimentaria y de higiene del proceso, observándose que frutas y menús sin tratamiento térmico presentaron los niveles más altos de contaminación.
- SEGUNDA El otoño fue la estación del año en la que se observó un mayor porcentaje de muestras positivas, obteniéndose, además, recuentos de aerobios mesófilos totales, enterobacterias y *Escherichia coli* significativamente mayores que en invierno. Por el contrario, el invierno fue la estación de menor riesgo microbiológico. Los resultados microbiológicos no se vieron influenciados por el modelo de gestión (directa o contratada).
- TERCERA Bajo el punto de vista nutricional, el valor energético de los menús fue correcto, excepto para los de iniciación de gestión directa, que fue menor a lo recomendado.
- CUARTA Los perfiles energéticos resultaron ser superiores a lo recomendado en proteína y grasa, e inferiores a lo recomendado en cuanto a hidratos de carbono en los menús de gestión contratada. Asimismo, todos los menús ofrecieron valores superiores en azúcares sencillos y fibra. Estos resultados son coincidentes con otros estudios epidemiológicos realizados en nuestro país.
- QUINTA El aporte de colesterol fue elevado en todos los menús excepto en los de iniciación de gestión directa. Globalmente, se detectó un adecuado perfil lipídico a excepción del elevado contenido de ácidos grasos saturados y de ácidos grasos *trans* en los menús de iniciación de gestión contratada. Se observaron unos valores adecuados de ácidos grasos omega-6, pero una deficiencia en ácidos grasos omega-3 en todos los menús.
- SEXTA Los aportes medios diarios de vitaminas y minerales, en su conjunto, fueron adecuados. No obstante, destacaron algunos desequilibrios: un escaso aporte de vitamina D, yodo y zinc; un excesivo aporte de vitamina K, selenio, potasio y de sodio (menús completos); y una relación calcio/fósforo no adecuada.
- SÉPTIMA En los menús de gestión contratada se observó una oferta baja de alimentos como arroz, huevos, pescado, ensaladas y frutas. El grupo de los pescados fue el que menos rotó, con predominio de

merluza y carencia de pescado azul. Tanto la variedad de recetas como de técnicas culinarias, en su conjunto, se ajustaron a las recomendaciones para comedores escolares.

- OCTAVA La presencia de sustancias que pueden causar reacciones de hipersensibilidad alimentaria en los menús especiales fue muy baja (proteína de leche y gluten en sendas muestras). No obstante, no se puede concluir que el riesgo no sea significativo y se deben reforzar las medidas de control.
- NOVENA El control de calidad analítico de los kits utilizados (curva de calibrado, exactitud y precisión) mostró resultados satisfactorios, excepto en la recuperación de la proteína de leche a partir de los materiales de referencia MoniQA. Esto supone un avance en el conocimiento de datos sobre la fiabilidad de los resultados obtenidos, y nos hace estar a la vanguardia en este tipo de estudios.
- DÉCIMA Los resultados obtenidos nos han permitido proponer una serie de medidas de mejora a implementar tanto en el autocontrol de la empresa que gestiona los comedores de los centros de educación infantil, como en el control oficial de los mismos llevado a cabo por la Inspección General de Sanidad de la Defensa. Entre estas medidas se incluye una revisión y mejora de los planes generales de higiene de la empresa y de la evaluación nutricional de los menús, la validación de técnicas analíticas, así como la inclusión de nuevos parámetros en las campañas de control oficial.

## CONCLUSIONS

---



## CONCLUSIONS

Based on our findings, presented in this Doctoral Thesis, we have established the following major conclusions:

- FIRST From a microbiological point of view, when examining pathogenic and indicator microorganisms, the analyzed samples showed a high level of food safety and process hygiene criteria, with fruits and non-heat-treated meals showing the highest levels of contamination.
- SECOND Autumn was the season with the highest percentage of positive samples and with statistically significant higher counts in total mesophilic aerobes, *Enterobacteriaceae* and total coliforms in comparison with winter. By contrast, winter showed the lowest microbiological risk. The management model (direct and catering) did not influence the microbiological results.
- THIRD From a nutritional point of view, the energy content of the menus was appropriate, except for the infant menus of direct management, which were lower than the recommended content.
- FOURTH The energy profiles showed an excess of protein and fat in relation to the recommendations and a carbohydrates deficiency in catered menus according to the food recommendations. Moreover, all menus showed high levels of simple sugars and fiber. These results are in line with other epidemiologic studies carried out in our country.
- FIFTH Cholesterol intake was high in all menus, except for infant menus of the direct management model. Globally, an adequate lipid profile was detected, with the exception of the high content of saturated and trans-fatty acids in the catered menus for infants. Appropriate omega-6 fatty levels were detected, but we observed an omega-3 fatty acids deficiency in all menus.
- SIXTH The average daily vitamin and mineral supply was overall appropriate. However, some unbalances were low vitamin D, iodine and zinc supply; an excess of vitamin K, selenium, potassium and sodium (complete menus); and an inadequate calcium/phosphorous ratio.
- SEVENTH Catering menus showed a low offer of rice, eggs, fish, salads and fruits. The food rotation was low in the fish group, in which hake was predominant and there was a lack of fatty fish. Both the overall variety of the recipes and the variety in culinary techniques were in line with the recommendations for school canteens.

- EIGHT The presence of substances causing food hypersensitivity reactions was very low in special menus (cow's milk protein in one and gluten in another). Nevertheless, it can not be concluded that the risk is not significative and control measures must be reinforced.
- NINTH The analytical quality control in the test kits we used (calibration curve, accuracy and precision) showed satisfactory results, except for the recovery of cow's milk protein from the MoniQA reference materials. This means a progress in the knowledge about the feasibility of the results was obtained and thus allows us to be at the forefront of this kind of studies.
- TENTH As a consequence of our results we have presented a proposal for improving the self-monitoring in childcare centres and the official control carried out by the Health Authority of the Ministry of Defense. These measures include the review and improvement of general hygiene plans by the company, nutritional evaluation of the menus, validation of the analytical techniques, as well as the inclusion of new parameters in official control campaigns

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasheim, E.T., Sharp, S.J., Appleby, P.N., Shipley, M.J., Lentjes, M.A. H., Khaw, K.T., Brunner, E., Key, T.J. y Wareham, N.J. 2015. Tinned Fruit Consumption and Mortality in Three Prospective Cohorts. *PLoS One* 10 (2): e0117796.
- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C. y Viñas I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int J Food Microbiol*, 123 (1-2): 121-129.
- Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., Godefory, S.B., Ulberth, F., Van Hengel, A.J., Roberts, J., Akiyama, H., Popping, B., Yeung, J.M., Wehling, P., Taylor, S.L., Poms, R.E. y Delahaut, P. 2010. Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. *J AOAC Int*, 93 (2): 442-450.
- Acikel, C.H., Ogur, R., Yaren, H., Gocgeldi, E., Ucar, M. y Kir, T. 2008. The hygiene training of food handlers at a teaching hospital. *Food Control*, 19 (2): 186-190.
- Adams M. y Moss M. 2007. Bacterial Agents of Foodborne Illness. En: *Food Microbiology*, Capítulo 7, 3ª ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry [en línea]. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9780854042845-00182/978-0-85404-284-5> [Consulta: 25 mayo 2020].
- AECOSAN (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2011a. Recomendaciones de consumo por la presencia de nitratos en hortalizas [en línea]. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/para\\_consumidor/Recomendaciones\\_nitratos.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/para_consumidor/Recomendaciones_nitratos.pdf) [Consulta: 16 marzo 2020].
- AECOSAN (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2011b. Recomendaciones de consumo de pescado para poblaciones sensibles debido a la presencia de mercurio [en línea]. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/para\\_consumidor/Recomendaciones\\_mercurio.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/para_consumidor/Recomendaciones_mercurio.pdf) [Consulta: 18 marzo 2020].
- AECOSAN (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2015. Contenido de sal en los alimentos en España. MSSSI, Madrid [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/estudio\\_contenido\\_sal\\_alimentos.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/estudio_contenido_sal_alimentos.pdf) [Consulta: 18 marzo 2020].
- AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación). Norma UNE-EN ISO 16140-2:2016. Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia.

- AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación). Norma UNE-EN ISO/IEC 17025: 2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación). Norma UNE-EN ISO 15842:2020. Productos alimenticios. Detección de alérgenos alimentarios. Consideraciones generales y validación de los métodos.
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2005a. Estrategia de Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad (NAOS). Invertir la tendencia de la obesidad [en línea]. Disponible en: <http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/estrategianaos.pdf>. [Consulta: 21 marzo 2020].
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2005b. Código de correulación de la publicidad de alimentos y bebidas dirigidas a menores, para prevención de la obesidad y salud (Código PAOS) [en línea]. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/nutricion/seccion/marketing\\_y\\_publicidad\\_dirigida\\_a\\_menores.htmf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/nutricion/seccion/marketing_y_publicidad_dirigida_a_menores.htmf). [Consulta: 21 marzo 2020].
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2007. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre Alergias Alimentarias [en línea]. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/ALERGIAS\\_ALIMENTARIAS.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/ALERGIAS_ALIMENTARIAS.pdf) [Consulta: 26 diciembre 2019]
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2010a. BEDCA. Base de Datos Española de Composición de Alimentos v1.0 [en línea]. Disponible en: <https://www.bedca.net/> [Consulta: 12 marzo 2020].
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2010b. Reedición 2010 Estrategia NAOS alimentación sana para todos. MSSSI, Madrid. [en línea]. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/alimentacion\\_sana\\_para\\_todos.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/alimentacion_sana_para_todos.pdf) [Consulta: 18 marzo 2020].
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2013. Estudio ALADINO 2011: Estudio sobre Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad en España. 2019. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Madrid [en línea]. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/nutricion/detalle/estudio\\_ALADINO.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/nutricion/detalle/estudio_ALADINO.htm) [Consulta: 07 marzo 2020].
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2019a. Recomendaciones de consumo de pescado por presencia de mercurio [en línea]. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/seguridad\\_alimentaria/RECOMENDA-](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/seguridad_alimentaria/RECOMENDA-)

CIONES consumo pescado MERCURIO AESAN WEB.PDF [Consulta: 18 marzo 2020].

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2019b. Memoria del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI) año 2018 [en línea]. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/alertas/sciri/MEMORIA\\_ALERTAS\\_SCIRI\\_2018.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/alertas/sciri/MEMORIA_ALERTAS_SCIRI_2018.pdf) [Consulta: 29 diciembre 2019].

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2020a. Recomendaciones de consumo de hortalizas de hoja para la población infantil por la presencia de nitratos [en línea]. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/para\\_el\\_consumidor/ampliacion/nitratos\\_hortalizas.htm#:~:text=La%20Asociaci%C3%B3n%20Espa%C3%B1ola%20de%20Pediatr%C3%ADa,partir%20de%20los%2012%20meses](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/para_el_consumidor/ampliacion/nitratos_hortalizas.htm#:~:text=La%20Asociaci%C3%B3n%20Espa%C3%B1ola%20de%20Pediatr%C3%ADa,partir%20de%20los%2012%20meses) [Consulta: 14 noviembre 2020].

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2020b. Estudio ALADINO 2019: Estudio sobre Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad en España. 2019. Ministerio de Consumo. Madrid [en línea]. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/nutricion/detalle/aladino\\_2019.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/nutricion/detalle/aladino_2019.htm) [Consulta: 28 noviembre 2020].

Afshin, A., Micha, R., Khatibzadeh, S. y Mozaffarian, D. 2014. Consumption of nuts and legumes and risk of incident ischemic heart disease, stroke, and diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 100 (1): 278-288.

Aggett, P.J., Agostoni, C., Axelsson, I., Edwards, C.A., Goulet, O., Hernell, O., Koletzko, B., Lafeber, H.N., Micheli, J.L., Michaelsen, K.F., Rigo, J., Szajewska, H. y Weaver, L.T. 2003. Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 36: 329-337.

Aguirre, E. y Aguirre, S. 2013. Estudio y programa de mejora de la seguridad alimentaria en centros infantiles asturianos. *Rev toxicol*, 30: 165-170.

Ahrens, W., Pigeot, I., Pohlabeln, H., De Henauw, S., Lissner, L., Molnár, D., Moreno, L.A., Tornaritis, M., Veidebaum, T. y Siani, A. 2014. Prevalence of overweight and obesity in European children below the age of 10. *Int J Obes*, 38: S99-S107.

Akineden, O., Murata, K.J., Grossleine, M. y Usleber, E. 2015. Microbiological Quality of Raw Dried Pasta from the German Market, with Special Emphasis on *Cronobacter* Species. *J Food Sci*, 80: 2860-2867.

Aksu, F., Sandikçi, S., Issa, G., Aksoy, A. y Aksu, H. 2019. Prevalence of *Cronobacter* spp. in various foodstuffs and identification by multiplex PCR. *Food Sci Technol*, 39 (3): 729-734.

- Alarcón, B., Vicedo, B. y Aznar, R. 2006. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *J App Microbiol*, 100: 352-364.
- Alegre, I., Abadias, M., Anguera, M., Usall, J. y Viñas I. 2010. Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria innocua* on minimally-processed peaches under different storage conditions. *Food Microbiol*, 27 (7): 862-868.
- Alegría, E., Castellano, J.M. y Alegría, A. 2008. Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica. *Rev Española Cardiol*, 61(7): 752-764.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F. y Di Ilio, C. 2013. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *Int J Environ Res Public Health*, 10: 6235-6254.
- Alonso, M. 2003. Crecimiento y desarrollo: una visión integral. En: Serra, L. y Aranceta, J. Crecimiento y desarrollo. Estudio enKid (pp. 1-9). Barcelona: Masson.
- Alonso, M.A. y Castellano, G. 2007. Conceptos generales de nutrición. Requerimientos nutricionales. En: Manual práctico de nutrición en pediatría. Capítulo 1. Asociación Española de Pediatría (AEP), Madrid.
- Altobelli, E., Paduano, R., Petrocelli, R., y Di Orio, F. 2014. Burden of celiac disease in Europe: a review of its childhood and adulthood prevalence and incidence as of September 2014. *Ann Ig*, 26 (6), 485-498.
- Alves, R.C., Barroso, M.F., González-García, M.B., Oliveira, M.B. y Deleue-Matos, C. 2016. New trends in food allergens detection: Towards biosensing strategies. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 56 (14): 2304-2319.
- Amaia-González, S., De los Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A.J. y Lobo-Castaño, M.J. 2014. Aptamer binding to celiac disease-triggering hydrophobic proteins: A sensitive gluten detection approach. *Anal Chem*, 86 (5): 2733-2739.
- Amaia-González, S., De los Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A.J., y Lobo-Castaño, M.J. 2015. Sensitive gluten determination in gluten-free foods by an electrochemical aptamer-based assay. *Anal Bioanal Chem*, 407 (20): 6021-6029.
- Aranceta, J., Pérez, C., Serra, L. y Delgado, A. 2004. Hábitos alimentarios de los alumnos usuarios de comedores escolares en España. Estudio «Dime Cómo Comes». *Atención Primaria*, 33 (3): 131-139.
- Aranceta, J., Pérez, C., Dalmau, J., Gil, A., Lama, R., Martín, M.A., Martínez, V., Pavón, P. y Suárez, L. 2008. El comedor escolar: situación actual y guía de recomendaciones. *An Pediatr*, 69 (1): 72-88.
- Aranceta y Pérez. 2015. El comedor escolar: organización y gestión. En: Rivero, M., Moreno, L., Dalmau, J., Moreno, J., Aliaga, A. y García, A. Libro

- blanco de la nutrición infantil en España. Capítulo V.3. 1ª ed. Zaragoza: Prensas de la Universidad de Zaragoza. 285-295.
- Aranceta-Bartrina, J., Pérez-Rodrigo, C., Santolaya-Jiménez, J. y Gondra-Rezola, J. 2013a. El Proyecto PERSEO en Bilbao: Evaluación preliminar. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 19: 88–97.
- Aranceta-Bartrina, J., Pérez, C., Campos, J. y Calderón, V. 2013b. Proyecto PERSEO: Diseño y metodología del estudio de evaluación. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 19 (2): 76-87.
- Aranceta-Bartrina, J., Partearroyo, T., López-Sobaler, A.M., Ortega, R. M., Varela-Moreiras, G., Serra-Majem, L. y Pérez-Rodrigo, C. 2019. Updating the Food-Based Dietary Guidelines for the Spanish Population: The Spanish Society of Community Nutrition (SENC) Proposal. *Nutrients*, 11: 2675-2702.
- Aranceta-Bartrina, J., Gianzo-Citores, M. y Pérez-Rodrigo, C. 2020. Prevalencia de sobrepeso, obesidad y obesidad abdominal en población española entre 3 y 24 años. Estudio ENPE. *Rev Esp Cardiol*, 73 (4): 290-299.
- Argaw, S. y Addis, M. 2015. A Review on Staphylococcal Food Poisoning. *Food Sci Qual Manage*, 40.
- Arseni, A., Malamou-Ladas, E., Koutsia, C., Trika, E. y Xanthou, M. 1987. Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. *J Hosp Infect*, 9 (2): 143-150.
- Ávila, J.M. y Valerro, T. 2015. Escuelas infantiles. En: Rivero, M., Moreno, L., Dalmau, J., Moreno, J., Aliaga, A. y García, A. Libro blanco de la nutrición infantil en España. Capítulo V.4. 1ª ed. Zaragoza: Prensas de la Universidad de Zaragoza. 277-284.
- Aycicek, H., Oguz, U. y Karci K. 2006. Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. *Int J Hyg Environ Health*, 209: 197-201.
- Badosa, E., Trias, R., Parés, D., Pla, M. y Montesinos, E. 2008. Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalised plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR). *J Sci Food and Agric*, 88 (4): 605–611.
- Baird-Parker, A. 1974. The basis for the present classification of *staphylococci* and *micrococci*. *Ann NY Acad Sci*, 236: 6–13.
- Bances, M., Herrero, A., González, Y., Rodicio, R. y González-Hevia, M. A. 2007. Brote de gastroenteritis en una guardería causado por una cepa de *Salmonella* enterica serovar Typhimurium portadora del plásmido híbrido de resistencia-virulencia pUO-StVR2. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 25 (6): 376.

- Baumgartner, A., Grand, M., Liniger, M. y Iversen C. 2009. Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. *Int J Food Microbiol*, 136 (2): 189-192.
- Bello, J., Candela, M. y Astiasarán, I. 1998. Tablas de composición para platos cocinados. Madrid: Díaz de Santos.
- Bellón, S., Díaz, S., Muñoz, M., Alonso, P., García, J., Torija, P., Bracamonte, T., Quevedo, S. y Echeverría, L.A. (10-12 mayo de 2018). Incidencia de alergia alimentaria a los 12 meses de edad en una cohorte de recién nacidos. En *XLII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología Clínica, Alergología y Asma Pediátrica*. Málaga.
- Bennett, R. y Monday, S. 2003. *Staphylococcus aureus*. En: Marianne D. Miliotis and Jeffrey W. Bier (eds.), International handbook of foodborne pathogens, Pp. 53-69. Marcel Dekker, Inc. New York, NY.
- Bergdoll, M.S., Surgalla, M.J. y Dack, G.M. 1959. Staphylococcal enterotoxin. I. Purification. *Arch Biochem Biophys*, 85: 62-69.
- Bergdoll, M. y Lee Wong, A. 2006. Staphylococcal intoxications. En: Foodborne Infections and Intoxications; Reimann, P. and Cliver. D. 3rd Ed.; Academic Press, Elsevier: New York, NY, USA, Pp: 523-525.
- Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P. *et al.* 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol*, 12 (9): 2385-2397.
- Berradre-Sáenz, B., Royo-Bordonada, M.A., Bosqued, M.J., Moya, M.Á. y López, L. 2015. Menú escolar de los centros de enseñanza secundaria de Madrid: conocimiento y cumplimiento de las recomendaciones del Sistema Nacional de Salud. *Gac Sanit*, 29 (5): 341-346.
- Bertoldi, B., Richardson, S., Goodrich, R., Kurdmongkoltham, P. y Schneider, R. 2018. Preventing Foodborne Illness: *E. coli* "The Big Six" en línea. Disponible en: <https://nifa.usda.gov/sites/default/files/resource/Preventing-Foodborne-Illness-E-coli-the-big-six.pdf> [Consulta: 30 mayo 2020].
- Bettazzi, F., Lucarelli, F., Palchetti, I., Berti, F., Marrazza, G., y Mascini, M. 2008. Disposable electrochemical DNA-array for PCR amplified detection of hazelnut allergens in foodstuffs. *Anal Chim Acta*, 614 (1): 93-102.
- Beuchat, L.R., Copeland, F., Curiale, M.S., Danisavich, T., Gangar, V., King, B. W., Lawlis, T.L., Likin, R.O., Okwusoa, J., Smith, C.F. y Townsend, D.E. 1998. Comparison of the SimPlate Total Plate Count Method With Petri-film, Redigel, Conventional Pour-Plate Methods for Enumerating Aerobic Microorganisms in Foods. *J Food Prot*, 61 (1): 14-18.
- Beuchat, L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microb Infect*, 4 (4): 413-423.

- Bjerregaard, L.G., Adelborg, K. y Baker, J.L. 2020. Change in body mass index from childhood onwards and risk of adult cardiovascular disease. *Trends Cardiovas Med*, 30 (1): 39-45.
- Blasco, R., Murphy, M.J., Sanders, M.F. y Squirrell, D.J. 1998. Specific assays for bacteria using phage mediated release of adenylate kinase. *J Appl Microbiol*, 84: 661-666.
- BOCM (Boletín Oficial de la Comunidad de Madrid). 2018a. Recomendaciones dietético nutricionales de lactantes (6-12 meses). Dirección General de Salud Pública de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, Ed. Diciembre 2018.
- BOCM (Boletín Oficial de la Comunidad de Madrid). 2018b. Recomendaciones dietético nutricionales de preescolares (1-3 años). Dirección General de Salud Pública de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, Ed. Diciembre 2018.
- Boer E. y Beumer, R. R. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol*, 50: 119-130.
- Bogdanovičová, K., Kameník, J., Dorotíková, K., Strejček, J., Křepelová, S., Dušková, M. y Haruštiaková, D. 2019. Occurrence of Foodborne Agents at Food Service Facilities in the Czech Republic. *J Food Prot*, 82 (7): 1096-1103.
- Bolton, D.J., Monaghan, A., Byrne, B., Fanning, S., Sweeney, T. y McDowell, D. A. 2011. Incidence and survival of non-O157 verocytotoxigenic *Escherichia coli* in soil. *J Appl Microbiol*, 111: 484-490.
- Bosqued, M.J. y Royo-Bordonada, M.A. 2017. Hábitos alimentarios: adquisición y modificación. En: Royo-Boordanada (coord.). Nutrición en Salud Pública. Capítulo 4. Madrid: Escuela Nacional de Sanidad, Instituto de Salud Carlos III.
- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M. y Neviani, E. 2006. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73: 485-494.
- Botteldoorn, N., Van Coillie, E., Piessens, V., Rasschaert, G., Debruyne, L., Heyndrickx, M., Herman, L. y Messens, W. 2008. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. *J App Microbiol*, 105: 1909-1918
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H. y Straif, K. 2015. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol*, 16 (16): 1599-1600.
- Brandao, M.L.L., Umeda, N.S., Jackson, E., Forsythe, S.J. y De Filippis, I. 2017. Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retail foods. *Food Microbiol*, 63: 129-138.

- Brandl, M.T. 2008. Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on postharvest lettuce. *Appl Environ Microbiol*, 74: 5285–5289.
- Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C. y Whiting, R.C. 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1–13.
- Calvo, M.V., Castro-Gómez, M.P., García-Serrano, A., Rodríguez-Alcalá, L.M., Juárez, M. y Fontecha, J. 2014. Grasa láctea: una fuente natural de compuestos bioactivos. *Alim Nutri Salud*, 21 (3): 57-63.
- Campos, J., Rodríguez, C., Sierra, A. y Arias, Á. 2003. Estudio microbiológico de las comidas servidas en los comedores escolares de la isla de Tenerife. *Rev Esp Salud Pública*, 77 (6): 749-760.
- Campos, J., Rodríguez, C., Calvo, M., Arévalo, M.P., Sierra, A. y Arias, A. 2008. Valoración nutricional de los menús escolares de los colegios públicos de la isla de Tenerife. *Nutr Hosp*, 23 (1): 41-45.
- Cañedo-Argüelles, C.A., Fernández M., García, C. et al. 2019. Alimentación del lactante y del niño de corta edad. Guías conjuntas de Patología Digestiva Pediátrica Atención Primaria-Especializada [en línea]. Disponible en: <http://www.ampap.es/wp-content/uploads/2019/04/Alimentacion-del-lactante-y-del-ni%C3%B1o-de-corta-edad.pdf> [Consulta: 09 marzo 2020].
- Carpentier, B. y Cerf, O. 2011. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol*, 145 (1): 1–8.
- Carughi, A., Feeney, M.J., Kris-Etherton, P., Fulgoni, V., Kendall, C.W. C., Bullo, M. y Webb, D. 2015. Pairing nuts and dried fruit for cardiometabolic health. *Nutr J*, 15: 23.
- Castro, M., Ríos-Reina, R., Úbeda, C. y Callejón, R.M. 2016. Evaluación de menús ofertados en comedores escolares: comparación entre colegios públicos, privados y concertados. *Rev Nutr*, 29 (1): 97-108.
- Caubilla-Barron, J., Hurrell, E., Townsend, S., Cheetham, P., Loc-Carrillo, C., Fayet, O., Prère, M.F. y Forsythe, S.J. 2007. Genotypic and Phenotypic Analysis of *Enterobacter sakazakii* Strains from an Outbreak Resulting in Fatalities in a Neonatal Intensive Care Unit in France. *J Clin Microbiol*, 45: (12): 3979-3985.
- Céline, J. Ohlsson, C., Bygdell, M., Nethander, M. y Kindblom, M. 2019. Childhood Body Mass Index is associated with risk of adult colon cancer in men - an association modulated by pubertal change in Body Mass Index. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 974-979. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-1077.

- Cena, H. y Calder, P.C. 2020. Defining a Healthy Diet: Evidence for The Role of Contemporary Dietary Patterns in Health and Disease. *Nutrients*, 12 (2): 334. Published 2020 Jan 27. doi:10.3390/nu12020334
- Chap, J., Jackson, P., Siqueira, R., Gaspar, N., Quintas, C., Park, J. *et al.* 2009. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int J Food Microbiol*, 136 (2): 185-188.
- Chauret, C. 2011. Survival and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods, beverages, soil and water. *Virulence*, 2: 593–601.
- Chen, F.C. y Godwin, S.L. 2006. Comparison of a Rapid ATP Bioluminescence Assay and Standard Plate Count Methods for Assessing Microbial Contamination of Consumers' Refrigerators. *J Food Prot*, 69 (10): 2534-2538.
- Cheung, G. y Otto, M. 2010. Understanding the significance of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in babies and children. *Curr Opin Infect Dis*, 23: 208–216.
- Costa, J., Mafra, I. y Oliveira M.B.P.P. 2012. High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. *Food Chem*, 133 (3), 1062-1069.
- Costa, J., Fernandes, T.J.R., Villa, C., Oliveira, M.B.P.P. y Mafra, I. 2016. Advances in food allergen analysis. En: *Food Safety: Innovative analytical tools for safety assessment*. Ed. por Spizzirri, U. G., y Cirillo, G., Italy: Wiley-Scrivener, 305-359.
- Crabtree, J.A. y Litterer, W. 1934. Outbreak of Milk Poisoning Due to a Toxin-Producing *Staphylococcus* Found in the Udders of Two Cows. *Am J Public Health*, 24 (11): 1116–1122.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M. y Finlay, B.B. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 26 (4): 822-880.
- Cuadrado, C., Del Pozo, S. y Valero, T. 2015. El comedor escolar: modelos e influencia sobre la salud infantil. En: Rivero, M., Moreno, L., Dalmau, J., Moreno, J., Aliaga, A. y García, A. Libro blanco de la nutrición infantil en España. Capítulo V.4. 1ª ed. Zaragoza: Prensas de la Universidad de Zaragoza. 297-303.
- Cuadrado-Soto, E., López-Sobaler, A.M., Jiménez-Ortega, A.I., Aparicio, A., Bermejo, L.M., Hernández-Ruiz, Á., Lara, F., Leis, R., Martínez de Victoria, E., Moreno, J.M., Ruiz-López, M.D., Soto-Méndez, M.J., Valero, T., Varela-Moreiras, G., Gil, Á. y Ortega, R.M. 2020. Usual dietary intake, nutritional adequacy and food sources of calcium, phosphorus, magnesium and vitamin D of Spanish children aged one to <10 years. Findings from the EsNuPI Study. *Nutrients*, 12 (6): 1787.

- Cuervo, M., Baladia, E., Goñi, L., Corbalán, M., Manera, M., Basulto, J., Pérez, S., Abete, I. y Martínez, J. A. 2010. Propuesta de ingestas dietéticas de referencia (IDR) para la población. En: Ingestas dietéticas de referencia (IDR) para la población española. Capítulo 5. Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD).
- Cuevas-Casado, M.M. Romero-Fernández, M.M. y Royo-Bordonada, M.A. 2012. Uso del marketing nutricional en productos anunciados por televisión en España. *Nutr Hosp*, 27 (5): 1569-1575.
- Curiale, M. S., Gangar, V. y Gravens, C. 1997. VIDAS Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay for Detection of *Salmonella* in Foods: Collaborative Study. *J AOAC Int*, 80 (3): 491-504.
- Dalmau, J., Peña-Quintana, L., Moráis, A., Martínez, V., Martínez, M.J. y Soler, B. 2015. Quantitative analysis of nutrient intake in children under 3 years old. ALSAMA study. *An Pediatr*, 82 (4): 255-266.
- Daniels, L., Heath, A.L., Williams, S.M., Cameron, S.L., Fleming, E.A., Taylor, B.J., Wheeler, B.J., Gibson, R.S., Taylor y R.W. 2015. Baby-Led Introduction to Solids (BLISS) study: a randomised controlled trial of a baby-led approach to complementary feeding. *BMC Pediatr*, 15: 179
- Davidson, P.M., Roth, L.A. y Gambrel-Lenarz, S.A. 2004. Coliform and other indicator bacteria. En: *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 17th Ed , eds H. M. Wehrand J. F. Frank (Washington, DC: American Public Health Association): 187–227.
- DeGeorge, K.C., Frye, J.W., Stein, K.M., Rollins, L.K. y McCarter, D.F. 2017. Celiac disease and gluten sensitivity. *Prim Care*, 44 (4): 693-707.
- De Burgos, C. 2017. Los Nutrientes. En Royo-Bordonada, M. A. (coord.). Nutrición en Salud Pública. Capítulo 2. Madrid: Escuela Nacional de Sanidad, Instituto de Salud Carlos III.
- De la Cruz, S., López-Calleja, I., Martín, R., González, I., Alcocer, M. y García, T. 2017. Recent advances in the detection of allergens in foods. En: *Food allergens: Methods and protocols*. Ed. por Lin, J. y Alcocer, M., University of Hertfordshire: Humana Press, 263-295.
- De Mateo, B., Camina, M.A., Ojeda, B., Carreño, L., De la Cruz, S., Marugán, J.M. y Redondo, P. 2015. Diseño y aplicación de un cuestionario de calidad dietética de los menús escolares. *Nutr Hosp*, 31 (1): 225-235.
- Del Pozo, S., Cuadrado, C., Rodríguez, M., Quintanilla, L., Ávila, J.M. y Moreira, O. 2006. Planificación nutricional de los menús escolares para los centros públicos de la Comunidad de Madrid. *Nutr Hosp*, 21 (6): 667-672.
- Díez, S., Rodríguez, C., Alonso, O., Gutiérrez, M.C. y Allande, R. 2018. Evaluación de la variedad y calidad en los menús escolares de Asturias. Curso 2015/2016. 2018. *Rev Esp Salud Pública*, 92 (9): 1-12.

- Do, A.B., Khuda, S.E. y Sharma, G.M. 2018. Undeclared food allergens and gluten in commercial food products analyzed by ELISA. *J AOAC Int*, 101 (1): 23-35.
- Domellöf, M., Braegger, C., Campoy, C., Colomb, V., Decsi, T., Fewtrell, M., Hojsak, I., Mihatsch, W., Molgaard, C., Shamir, R., Turck, D. y Van Goudoever, J.; ESPGHAN Committee on Nutrition. 2014. Iron requirements of infants and toddlers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 58: 119–29.
- Dons, L., Rasmussen, O.F. y Olsen, J.E. 1992. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, 6 (20): 2919-29.
- Doyle, M.P., Glass, K.A., Beery, J.T., Garcia, G.A., Pollard, D.J. y Schultz, R.D. 1987. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. *Appl Environ Microbiol*, 53 (7): 1433-1438.
- Doyle, M.P., Erickson, M.C. 2006. Closing the Door on the Fecal Coliform Assay. *Microb Magazine*, 1 (4): 162-163.
- Duffy, G.F. y Moore E.J. 2017. Electrochemical Immunosensors for Food Analysis: A Review of Recent Developments, *Anal Lett*, 50 (1): 1-32.
- DunnGalvin, A., Chan, C.H., Crevel, R., Grimshaw, K., Poms, R., Schnadt, S., Taylor, S.L., Turner, P., Allen, K.J., Austin, M., Baka, A., Baumert, J.L., Baumgartner, S., Beyer, K., Bucchini, L., Fernández-Rivas, M., Grinter, K., Houben, G.F., Hourihane, J., Kenna, F., Kruizinga, A.G., Lack, G., Madsen, C.B., Mills, C.E.N., Papadopoulos, N.G., Alldrick, A., Regent, L., Sherlock, R., Wall, J.M. y Roberts, G. 2015. Precautionary allergen labelling: perspectives from key stakeholder groups. *Allergy*, 70 (9): 1039-1051.
- Du Toit, G., Foong, R.X.M. y Lack, G. 2016. Prevention of food allergy: Early dietary interventions. *Allergol Int*, 65 (4): 370-377.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010a. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for water. *EFSA J*, 8 (3): 1459.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010b. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J*, 8 (3): 1461.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010c. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA J*, 8 (3): 1462.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010d. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to whole grain. *EFSA J*, 8 (10): 1766-1782.

- EFSA (European Food Safety Authority). 2012. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. *EFSA J*, 10 (2): 2557.
- EFSA. (European Food Safety Authority). 2014. Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes [en línea]. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/consultation/140523.pdf> [Consulta: 02 noviembre 2019].
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre For Disease Prevention And Control). 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J*, 14 (12). [en línea]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/EU-summary-report-trends-sources-zoonoses-2015.pdf> [Consulta: 22 mayo 2020].
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2018. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multilocus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update. *EFSA Supporting Publications*, 15 (7).
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report [en línea]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/zoonoses-EU-one-health-2018-report.pdf> [Consulta: 22 mayo 2020].
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2019b. Multi-country outbreak of *Salmonella* Poona infections linked to consumption of infant formula [en línea]. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1594> [Consulta: 22 mayo 2020].
- Ehlert, A., Demmel, A., Hupfer, C., Busch, U. y Engel, K.H. 2009. Simultaneous detection of DNA from 10 food allergens by ligation-dependent probe amplification. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 26 (4): 409-418.
- Elli, L., Branchi, F., Tomba, C., Villalta, D., Norsia, L., Ferretti, F., Roncoroni, L. y Bardella, M. T. 2015. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World J Gastroenterol*, 21 (23): 7110-7119.
- Elliott, C.D. y Conlon, M.J. 2015. Packaged baby and toddler foods: Questions of sugar and sodium. *Pediatr Obes*, 10:149-155.
- Ellis, P. y Meldrum, R. 2002. Comparison of the Compact Dry TC and 3M Petri. Im ACP Dry Sheet Media Methods with the Spiral Plate Method for the

- Examination of Randomly Selected Foods for Obtaining Aerobic Colony Counts. *J Food Prot*, 65 (2): 423-425.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvado, J., Covas, M.I., Corella, D., Aros, F., Gómez-García, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R.M., Serra-Maje, L., Pinto, X., Basora J., Muñoz, M. A., Sorlí, J.V., Martínez, J.A., Fitó, M., Gea, A., Hernán, M.A. y Martínez-González, M.A. 2018. Primary Prevention of cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med*, 378 (25): e34.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1996. Cumbre Mundial sobre la Alimentación. [en línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/w3613s/w3613s00.htm>. [Consulta: 10 febrero 2020].
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2003. Food Energy: Methods of Analysis and Conversion Factors. Report of a technical workshop. *FAO Food and Nutrition Paper 77*, Rome, 3-6 Dec 2002 [en línea]. Disponible en: [http://www.fao.org/uploads/media/FAO\\_2003\\_Food\\_Energy\\_02.pdf](http://www.fao.org/uploads/media/FAO_2003_Food_Energy_02.pdf) [Consulta: 13 marzo 2020].
- Faour-Klingbeil, D., Murtada, M., Kuri, V. y Todd E.C.D. 2016. Understanding the routes of contamination of ready-to-eat vegetables in the Middle East. *Food Control*, 62: 125-133.
- Farran, A., Zamora, R. y Cervera, P. 2003. Tablas de composición de los alimentos del CESNID. Barcelona: Edicions UB McGrawHill Interamericana.
- Farré, R. 2015. Legislación española y cumplimiento. En: Rivero, M., Moreno, L., Dalmau, J., Moreno, J., Aliaga, A. y García, A. Libro blanco de la nutrición infantil en España. Capítulo V.4. 1ª ed. Zaragoza: Prensas de la Universidad de Zaragoza. 277-284.
- Fei, P., Jiang, Y., Gong, S., Li, R., Jiang, Y., Yuan, X., Wang, Z. y Kang, H. 2018. Genotyping occurrence and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in drinking water and food samples from Northeast, China. *J Food Prot*, 81 (3): 456-460.
- Feng, P. 1996. Emergence of rapid methods for identifying microbial pathogens in foods. *J AOAC Int*, 79: 809-812.
- Ferreira-Pêgo, C., Babio, N., Bes-Rastrollo, M., Corella, D., Estruch, R., Ros, E., Fitó, M., Serra-Majem, L., Arós, F., Fiol, M., Santos-Lozano, J.M., Muñoz-Bravo, C., Pintó, X., Ruiz-Canela, M. y Salas-Salvadó, J. 2016. Frequent consumption of sugar and artificially sweetened beverages and natural and bottled fruit juices is associated with an increased risk of metabolic syndrome in a Mediterranean population at high cardiovascular disease. *J Nutr*, 146 (8): 1528-1536.

- Fewtrell, M., Bronsky, J., Campoy, C., Domello, M., Embleton, N., Fidler, N., Hojsak, I., Hulst, J.M., Indrio, F., Lapillonne, A. y Molgaard, C. 2017. Complementary Feeding: A Position Paper by the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 64: 119–132.
- Fidler, N., Braegger, C., Bronsky, J., Campoy, C., Domellöf, M., Embleton, N.D., Hojsak, I., Hulst, J., Indrio, F., Lapillonne, A., Mihatsch, W., Molgaard, C., Vora, R. y Fewtrell, M. 2017. Sugar in Infants, Children and Adolescents: A Position Paper of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 65 (6): 681-696.
- Finkelstein, E.A., Graham, W.C. y Malhotra, R. 2014. Lifetime direct medical costs of childhood obesity. *Pediatrics*, (133): 854-62.
- Fiore, A., Casale, M. y Aureli, P. 2008. *Enterobacter sakazakii*: epidemiology, clinical presentation, prevention and control. *Ann Ist Super Sanità*, 44 (3): 275-280.
- FNB (Food Nutrition Board). 2000. Dietary Reference Intakes: applications in dietary assessment. Institute of Medicine. Washington (DC): National Academies Press (US) [en línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25057725> [Consulta: 13 marzo 2020].
- Forestell, C.A. 2017. Flavor perception and preference development in human infants. *Ann Nutr Metab*, 70 (suppl 3): 17-25.
- Foterek, K., Buyken, A.E., Bolzenius, K., Hilbig, A., Nöthlings, U. y Alexy, U. 2016. Commercial complementary food consumption is prospectively associated with added sugar intake in childhood. *Br J Nutr*, 115 (11): 2067-2074.
- Friedemann, M. 2007. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int J Food Microbiol*, 116 (1): 1-10.
- Fukuda, S., Tatsumi, H., Igimi, S. y Yamamoto, S. 2005. Improved Bioluminescent Enzyme Immunoassay for the Rapid Detection of *Salmonella* in Chicken Meat Samples. *Lett Appl Microbiol*, 41 (5): 379-384.
- Fung, D.Y.C. 1994. Rapid methods and automation in food microbiology: a review. *Food Rev Int*, 10: 357-375.
- Furnari, G., Molino, N., Bruno, S., Quaranta, G., Laurenti, P. y Ricciardi, G. 2002. Efficacy and critical implications of food handlers' professional training: analysis of an experience. *Annali Di Igiene: Med Prev Comun*, 14 (5): 419-426.
- Garayoa, R., Díez-Leturia, M., Bes-Rastrollo, M., García-Jalón, I. y Vitas, A. I. 2014. Catering services and HACCP: Temperature assessment and surface hygiene control before and after audits and a specific training session. *Food Control*, 43: 193–198.

- García, L., Martín-Masot, R., Nestares, T. y Maldonado, J. 2019. Análisis de menús sin gluten de comedores escolares en Granada capital y área metropolitana: ¿son equilibrados?. *Nutr Hosp*, 36 (4): 912-918.
- García-Molina, M.D., Giménez, M. J., Sánchez-León, S., y Barro, F. 2019. Gluten Free Wheat: Are we there?. *Nutrients*, 11: 487-499.
- GBD (Global Burden of Diseases). 2019. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 393: 1958-1972.
- Garrity, G., Staley, J.T, Boone, D.R, De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F.A. *et al.* 2006. The Proteobacteria. En: *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, Vol 2. Springer Science & Business Media.
- Gebauer, S.K., Psota, T.L., Harris, W.S. y Kris-Etherton, P.M. 2006. N-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr*, 83 (Suppl.): 1526s-1535s.
- Geoffroy, M.C., Li, L., y Power, C. 2014. Depressive symptoms and body mass index: co-morbidity and direction of association in a British birth cohort followed over 50 years. *Psychol Med*, 44: 2641-2652.
- Geserick, M., Vogel, M., Gausche, R., Lipek, T., Spielau, U., Keller, E., Pfäffle, R., Kiess, W. y Körner, A. 2018. Acceleration of BMI in early childhood and risk of sustained obesity. *N Engl J Med*, 379: 1303–1312.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K.M., Gilani, A.H. y Saari N. 2012. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *Int J Mol Sci*, 13 (3): 3291-340.
- Gibson-Smith, D., Halldorsson, T.I., Bot, M., Brouwer, I.A., Visser, M., Thorsdottir, I., Birgisdottir, B.E., Gudnason, V., Eiriksdottir, G., Launer, L.J., Harris, T.B. y Gunnarsdottir, I. 2020. Childhood overweight and obesity and the risk of depression across the lifespan. *BMC Pediatr*, 20 (25).
- Gilbert, R.J., De Louvois, J., Donovan, T., Little, C., Nye, K., Ribeiro, C.D., Richards, J., Roberts, D. y Bolton, F.J. 2000. Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Commun Dis Public Health*, 3: 163-167.
- Ginn, R.E. Packard, V.S. y Fox, T.L. 1986. Enumeration of Total Bacteria and Coliforms in Milk by Dry Rehydratable Film Methods: Collaborative Study. *J Assoc Off Anal Chem*, 69 (3): 527-531.
- Glynn, B., Lahiff, S., Wernecke, M., Barry, T, Smith, T.J. y Maher, M. 2006. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. *Int J Dairy Technol*, 59: 126-139.
- Gómez, M. 2018 Recomendaciones de la Asociación Española de Pediatría sobre la alimentación complementaria. AEP, Madrid [en línea]. Disponi-

ble en: [https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/recomendaciones\\_aep\\_sobre\\_alimentacion\\_complementaria\\_nov2018\\_v3\\_final.pdf](https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/recomendaciones_aep_sobre_alimentacion_complementaria_nov2018_v3_final.pdf). [Consulta: 20 marzo 2020].

- González-Gross, M., Gómez-Lorente, J.J., Valtueña, J., Ortiz, J. C. y Meléndez, A. 2008. "The healthy lifestyle guide pyramid" for children and adolescents. *Nutr Hosp*, 23 (2): 159-168.
- Goran, M. I., Dumke, K., Bouret, S.G., Kayser, B., Walker, R.W. y Blumberg, B. 2013. The obesogenic effect of high fructose exposure during early development. *Nat Rev Endocrinol*, 9 (8): 494-500.
- Graça, A., Santo, D., Esteves, E., Nunes, C., Abadias, M. y Quintas, C. 2015. Evaluation of microbial quality and yeast diversity in fresh-cut apple. *Food Microbiology*, 51: 179-185.
- Graça, A., Esteves, E., Nunes, C., Abadias, M. y Quintas, C. 2017. Microbiological quality and safety of minimally processed fruits in the marketplace of southern Portugal. *Food Control*, 73 (B): 775-783.
- Greenwood, M., Willis, C., Doswell, P., Allen, G. y Pathak, K. 2005. Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. *J Appl Microbiol*, 99: 1340-1345.
- Gründling, A., Burrack, L. S., Bouwer, H. A. y Higgins, D.E. 2004. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proc Natl Acad Sci*, 101 (33): 12318–12323.
- Guallar-Castillón, P., Muñoz-Pareja, M., Aguilera, M.T., León-Muñoz, L. y Rodríguez-Artalejo, F. 2013. Food sources of sodium, saturated fat and added sugar in the Spanish hypertensive and diabetic population. *Atherosclerosis*, 229: 198-205.
- Gunasekera, T.S., Veal, D.A. y Atfield, P.V. 2003. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *Int J Food Microbiol*, 85: 269-279.
- Gupta, M., Cox, A., Nowak-Węgrzyn, A., y Wang, J. 2018. Diagnosis of food allergy. *Immunol Allergy Clin North Am*, 38 (1), 39-52.
- Gyles, C.L. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci*, 85: E45–E62.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. y Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2 (2): 95-108.
- He, F.J. y MacGregor, G.A. 2006. Importance of salt in determining blood pressure in children: Meta-analysis of controlled trials. *Hypertension*, 48 (5): 861-869.

- Hennekinne, J.A., Gohier, M., Maire, T., Lapeyre, C., Lombard, B. y Dragacci, S. 2003. First First Proficiency Testing To Evaluate the Ability of European Union National Reference Laboratories To Detect Staphylococcal Enterotoxins in Milk Products. *J AOAC Int*, 86 (2): 332-339.
- Hennekinne, J.A., Brun, V., De Bruyser, M.L., Dupuis, A., Ostyn, A. y Dragacci, S. 2009. Innovative Application of Mass Spectrometry for the Characterization of Staphylococcal Enterotoxins Involved in Food Poisoning Outbreaks. *Appl Environ Microbiol*, 75 (3): 882-884.
- Hennekinne, J.A., De Buyser, M.L. y Dragacci, S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *Fems Microbiol Rev*, 36 (4): 815-836.
- Henriques, A.R., Telo da Gama, L. y Fraqueza, M.J. 2014. Assessing *Listeria monocytogenes* presence in Portuguese ready-to-eat meat processing industries based on hygienic and safety audit. *Food Res Int*, 63: 81–88.
- Heyman, M.B. y Abrams, S.A., 2017. Fruit Juice in Infants, Children, and Adolescents: Current Recommendations. *Pediatrics*, 139 (6): e20170967.
- Himelright, I., Harris, E., Lorch V., Anderson, M., Jones, T., Craig, A., Kuehnert, M., Forster, T., Arduino, M., Jensen, B. y Jernigan, D. 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant Formula - Tennessee, 2001. *J Am Med Assoc*, 287 (17): 2204-2205.
- Hochel, I., Růžičková, H., Krásný, L. y Demnerová, K. 2012. Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. *J appl microbiol*, 112 (6): 1257-1265.
- Hodges, J.K., Cao, S., Cladis, D.P. y Weaver, C.M. 2019. Lactose Intolerance and Bone Health: The Challenge of Ensuring Adequate Calcium Intake. *Nutrients*, 11 (4): E718.
- Holck, A., Díaz-Amigo, C., Kerbach, S. y Popping, B. 2011. Detection of allergens in food. *Current Topics on Food Authentication*, 173-210.
- Holt, J. *et al.* 1994. Characteristics differentiating the species and subspecies of the genus *Staphylococcus*. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edn, Williams and Wilkins, Baltimore, MD. Pp: 544-551.
- HPA (Health Protection Agency of United Kingdom). 2009. Guidelines for assessing the microbiological safety of Ready-to-Eat foods placed on the market [en línea]. Disponible en: [http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140714084352/http://hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb\\_c/1259151921557](http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140714084352/http://hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb_c/1259151921557). [Consulta: 25 mayo 2020].
- Iglesias, C., Villarino, A.L., Martínez, J.A., Cabrerizo, L., Gargallo, M., Lorenzo, H., Quiles, J., Planas, M., Polanco, I., Romero de Ávila, D., Russolillo, J., Farré, R., Moreno, J.M., Riobó, P. y Salas-Salvadó J. 2011. Importancia del agua en la hidratación de la población española: documento FES-NAD 2010. *Nutr Hosp*, 26 (1): 27-36.

- Inomata, N. 2009. Wheat Allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 9 (3): 238-243.
- Iqbal, A., Shah, F., Jamal, Y., Hamayun, M., Islam, B., Khan, Z. H., Hussain, A., Rehman, G., Ziaullah, y Shah, S. 2018. Detection of food allergens by elisa and other common methods. *Fresen Environ Bull*, 27 (12): 8340-8346.
- ISCIII (Instituto De Salud Carlos III), Centro Nacional De Epidemiología. 2012. Brote supracomunitario de gastroenteritis por *Salmonella* Poona en 2010-2011. *Boletín epidemiológico semanal*, 19 (13): 176-185.
- ISCIII (Instituto de Salud Carlos III). 2017. Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2016. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología [en línea]. Disponible en: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=13/12/2018-8676bce649> [Consulta: 03 septiembre 2020].
- ISCIII (Instituto de Salud Carlos III). 2018. Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmisibles. Informe Anual. Año 2016. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología [en línea]. Disponible en: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=25/01/2019-d8ee271b6f> [Consulta: 03 septiembre 2020].
- ISCIII (Instituto de Salud Carlos III). 2019. Informe epidemiológico de listeriosis. Casos notificados a la RENAVE en los años 2015-2018. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología [en línea]. Disponible en: [https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/Informelisteriosis-RENAVE\\_2808209.pdf](https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/Informelisteriosis-RENAVE_2808209.pdf) [Consulta: 03 septiembre 2020].
- ISO Guide 33:2015. *Reference materials: Good practice in using reference materials*.
- Iversen, C. y Forsythe, S. 2004. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol*, 21 (6): 771-777.
- Iversen, C., Mullane, N., McCardel, B., Tal, B., Lehner, A., Fannin, S., Stephan, R. y Joosten, H. 2008. *Cronobacter* gen nov, a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen nov, comb nov, *Cronobacter malonaticus* sp nov, *Cronobacter turicensis* sp nov, *Cronobacter muytjensii* sp nov, *Cronobacter dublinensis* sp nov, *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp *dublinensis* subsp nov, *Cronobacter dublinensis* subsp *lausannensis* subsp nov and *Cronobacter dublinensis* subsp *lactaridi* subsp nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58: 1442-1447.
- Jardí, C., Aranda, N., Bedmar, C., Ribot, B., Elias, I., Aparicio, E. y Arijia, V. 2019. Ingesta de azúcares libres y exceso de peso en edades tempranas. Estudio longitudinal. *An Pediatr*, 90 (3): 165-172.

- Jasson, V., Rajkovic, A., Debevere, J. y Uyttendaele, M. 2009. Kinetics of resuscitation and growth of *L. monocytogenes* as a tool to select appropriate enrichment conditions as a prior step to rapid detection methods. *Food Microbiol*, 26: 88-93.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A. y Uyttendaele, M. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol*, 27(6): 710-730.
- Johansson, S.G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B. Q., Lockey, R.F., Motala, C., Ortega Martall, J.A., Platts-Mills, T.A., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P. y Williams, H.C. 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *J Allergy Clin Immunol*, 113 (5): 832-836.
- Johnson, P.E., Baumgartner, S., Aldick, T., Bessant, C., Giosafatto, V., Heick, J., Mamone, G., O'Connor, G., Poms, R., Popping, B., Reuter, A., Ulberth, F., Watson, A., Monaci, L. y Mills, E. N. 2011. Current perspectives and recommendations for the development of mass spectrometry methods for the determination of allergens in foods. *J AOAC Int*, 94 (4): 1026-1033.
- Jørgensen, F., Sadler-Reeves, L., Shore, J., Aird, H., Elviss, N., Fox, A., Kaye, M., Willis, C., Amar, C., De Pinna, E. y McLauchlin J. 2017. An assessment of the microbiological quality of lightly cooked food (including sous-vide) at the point of consumption in England. *Epidemiol Infect*, 145: 1500–1509.
- Joseph, S., Cetinkaya, E., Drahovska, H., Levican, A., Figueras, M.J. y Forsythe, S.J. 2012. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62 (6): 1277-1283.
- Jourdan-da Silva, N., Fabre, L., Robinson, E., Fournet, N., Nisavanh, A., Bruyand, M., Mailes, A., Serre, E., Ravel, M., Guibert, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Renaudat, C., Tourdjman, M., Septfons, A., De Valk, H. y Le Hello, S. 2018. Ongoing nationwide outbreak of *Salmonella* Agona associated with internationally distributed infant milk products, France, December 2017. *Euro Surveill*, 23 (2): 17-00852.
- Kandhai, M.C., Reij, M.W., Gorris, L.G., Guillaume-Gentil, O. y Van Schothorst, M. 2004 Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *The Lancet*, 363 (9402): 39-40.
- Kauffmann, F. y Henig, E. 1947. The Serology of the Coli Group. *J Imm*, 57 (1): 71-100.
- Kelly, R.K., Thomson, R., Smith, K.J., Dwyer, T., Venn, A. y Magnussen, C.G. 2015. Factors Affecting Tracking of Blood Pressure from Childhood to

- Adulthood: The Childhood Determinants of Adult Health Study. *J Pediatr*, 167 (6): 1422-1428.
- Kerbach, S., Aldrick, A.J., Crevel, R.W.R., Dömötör, L., DunnGalvin, A., Mills, E.N.C., Pfaff, S., Poms, R.E., Popping, B. y Tömösközi, S. 2009. Managing food allergens in the food supply chain: Viewed from different stakeholder perspectives. *Qual Assur Saf Crop*, 1 (1): 50-60.
- Khuda, S.E., Slate, A., Al-Taher, F., Jackson, L.S., Díaz-Amigo, C., Bigley, E.C., Whitaker, T. y Williams, K.M. 2012. Effect of processing on recovery and variability associated with immunochemical analytical methods for multiple allergens in a single matrix: sugar cookies. *J Agric Food Chem*, 60 (17): 4195-4203.
- Killer, J., Skrivanova, E., Hochel, I. y Marounek, M. 2015. Multilocus sequence typing of *Cronobacter* strains isolated from retail foods and environmental samples. *Foodborne Pathog Dis*, 12 (6):514-521.
- Kirsch, S., Fourdrilis, S., Dobson, R., Scippo, M.L., Maghuin-Rogister, G. y De Pauw, E. 2009. Quantitative methods for food allergens: a review. *Anal Bioanal Chem*, 395 (1): 57-67.
- Kloos, W. y Schleifer, K. 1975. Simplified scheme for routine identification of human *staphylococci*. *Clin Microbiol*, 1: 82-88.
- Kornacki, J.L. 2011. Indicator organism assays: chaos, confusion and criteria. *Food Saf Mag*, 17 (24): 26-28.
- Kostrzynska, M. y Bachand, A. 2006. Application of DNA microarray technology for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens. *Can J Microbiol*, 52: 1-8.
- Kouris-Blazos, A. y Belski, R. 2016. Health benefits of legumes and pulses with a focus on Australian sweet lupins. *Asia Pac J Clin Nutr*, 25 (1): 1-17.
- Kraemer, K., Semba, R.D., Eggersdorfer, M. y Schaumberg, D.A. 2012. Introduction: the diverse and essential biological functions of vitamins. *Ann Nutr Metab*, 61: 185-191.
- Kranz, S., Brauchla M., Slavin J.L. y Miller K.B. 2012. What do we know about dietary fiber intake in children and health? The effects of fiber intake on constipation, obesity, and diabetes in children. *Adv Nutr*, 3 (1): 47-53.
- Kretzer, J.W., Lehmann, R., Schmelcher, M., Banz, M., Kim, K. P., Korn, C. y Loessner, M.J. 2007. Use of High-Affinity Cell Wall-Binding Domains of Bacteriophage Endolysins for Immobilization and Separation of Bacterial Cells. *Appl Environ Microbiol*, 73 (6): 1992-2000.
- Kunicka, A. 2007. TEMPO® System Microbiological Analysis of Spices and Food Additives. *Pol J Food Nutr Sci*, 57 (3): 67-69.

- Labrador, M., Rota, M.C., Pérez-Arquillué, C., Herrera, A. y Bayarri, S. 2018a. Comparative evaluation of impedanciometry combined with chromogenic agars or RNA hybridization and real-time PCR methods for the detection of *L. monocytogenes* in dry-cured ham. *Food Control*, 94: 108-115.
- Labrador, M., Rota, M.C., Pérez, C., Herrera, A. y Bayarri, S. 2018b. Evaluation of a Method for Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Dry-Cured Ham Based on Impedanciometry Combined with Chromogenic Agar. *J Food Prot*, 81 (5): 705-712.
- Lacorn, M., Lindeke, S., Siebeneicher, S. y Weiss, T. 2018b. Commercial ELISA measurement of allergens and gluten: What we can learn from case studies. *J AOAC Int*, 101 (1): 102-107.
- Lado, B.H. y Yousef, A.E. 2007. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. *Food Sci Technol*, 157-214.
- Lai, K., 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults - Case reports and a review of the literature. *Medicine*, 80 (2): 113-122.
- Lambert, J., Agostoni, C., Elmadfa, I., Hulshof, K., Krause, E., Livingstone, B., Socha, P., Pannemans, D. y Samartín, S. 2004. Dietary intake and nutritional status of children and adolescents in Europe. *Br J Nutr*, 92 Suppl 2: S147-211.
- Larsson, S.C. y Orsini, N. 2014. Red meat and processed meat consumption and all-cause mortality: a meta-analysis. *Am J Epidemiol*, 79 (3): 282-289.
- Law, J.W.F., Ab Mutalib, N.S., Chan, K.G. y Lee, L.H. 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol*, 5 (770): 1-19.
- Lebwohl, B., Sanders, D.S. y Green P.H.R. 2018. Coeliac disease. *Lancet*, 391 (10115): 70-81.
- Leclerc, H., Mossel, D.A., Edberg, S.C. y Struijk, C.B. 2001. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu Rev Microbiol*, 55: 201-234.
- Leis, R., Méndez, M. y Tojo, R. 2007. Alimentación en guarderías y colegios. En: Comité de Nutrición de la AEP (ed.). Manual práctico de nutrición en Pediatría. Capítulo 11. 1.ª ed. Ergon. Madrid, pp. 147-165
- Lessa, K., Lozano, M., Esteve, M.J. y Frigola, A. 2016. Food allergy knowledge, attitudes and practices: A pilot study of the general public and food handlers. *European J Nutr Food Saf*, 6 (2): 58-64.
- Levine, M.M., Bergquist, E.J., Nalin, D.R., Waterman, D.H., Hornick, R.B., Young, C.R. y Sotman, S. 1978. *Escherichia coli* strains that cause diar-

- rhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are noninvasive. *Lancet*: 1119–1122.
- Levine, M.M. y Edelman, R. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev*, 6: 31–51.
- Lexhaller, B., Tompos, C. y Scherf, K.A. 2016. Comparative analysis of prolamin and glutelin fractions from wheat, rye, and barley with five sandwich ELISA test kits. *Anal Bioanal Chem*, (408): 6093-6104.
- Ley, S.H., Hamdy, O., Mohan, V. y Hu, F.B. 2014. Prevention and management of type 2 diabetes: dietary components and nutritional strategies. *Lancet*, 383: 1999- 2007.
- Le Loir, Y., Baron, F. y Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*, 2 (1): 63–76.
- Le Minor, L. y Popoff, M.Y. 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*: Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol*, 37 (4): 465-468.
- Libuda, L., Kersting, M. y Alexy, U. 2012. Consumption of dietary salt measured by urinary sodium excretion and its association with body weight status in healthy children and adolescents. *Public Health Nutr*, 15 (3): 433-441.
- Liem, D.G. 2017. Infants' and Children's Salt Taste Perception and Liking: A Review. *Nutrients*, 9 (9): 1011.
- Lindberg, A.M., Ljungh, Å., Ahrné, S., Löfdahl, S. y Molin, G. 1998. *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *Int J Food Microbiol*, 39 (1–2): 11-17.
- Ling, N., Li, C., Zhang, J., Wu, Q., Zeng, H., He, W., Ye, Y., Wang, J., Ding, Y., Chen, Mo., Xue, L., Ye, Q. y Guo, W. 2018. Prevalence and molecular and antimicrobial characteristics of *Cronobacter* spp. isolated from raw vegetables in China. *Front Microbiol*, 9: 1149.
- Ling, N., Forsythe, S., Qingping, W., Ding, Y., Zhang, J. y Zeng, H. 2020. Insights into *Cronobacter sakazakii* Biofilm Formation and Control Strategies in the Food Industry. *Engineering*, 6 (4): 393-405.
- Liu, H., Lu, L., Pan, Y., Sun, X., Hwang, C.A., Zhao, Y. y Wu, V. C.H. 2015. Rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. *Food Control*, 52, 78–84.
- Lomonaco, S., Nucera, D. y Filipello, V. 2015. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infect Genet Evol*, 35: 172–183.

- López-Gil, J.F., Renato, F. y Yuste, L. 2020. Programas de intervención para la promoción de hábitos alimenticios saludables en escolares españoles practicantes de Educación Física: una revisión sistemática. *Retos*, 37: 786-792.
- López-Sobaler, A.M. y Aparicio, A. 2014. El huevo en la dieta de las personas mayores; beneficios nutricionales y sanitarios. *Nutr Hosp*, 30 (Supl. 2): 56-62.
- López-Sobaler, A.M., Aparicio, A., González-Rodríguez, L.G., Cuadrado-Soto, E., Rubio, J., Marcos, V., Sanchidrián, R., Santos, S., Pérez-Farinós, N., Dar Re, M.A., Villar, C., Robledo, T., Castrodeza, J.J. y Ortega, R.M. 2017. Adequacy of Usual Vitamin and Mineral Intake in Spanish Children and Adolescents: ENALIA Study. *Nutrients*, 9 (2): 131.
- López-Sobaler, A.M., Cuadrado-Soto, E., Peral-Suárez, Á., Aparicio, A. y Ortega, R.M. 2018. Importancia del desayuno en la mejora nutricional y sanitaria de la población. *Nutr Hosp*, 35 (extra): 3-6.
- Lozoff, B., Corapci, F., Burden, M.J., Kaciroti, N., Angulo-Barroso, R., Sazawal, S. y Black, M. 2007. Preschool-aged children with iron deficiency anemia show altered affect and behavior. *J Nutr*, 137 (3): 683- 689.
- Lucas, B. y Feucht, S.A. 2009. Nutrición en la infancia. En L. Kathleen-Mahan y S. Escott-Stump, Krause Dietoterapia. 12ª ed., (pp. 222-245). Barcelona: Elsevier Masson.
- Ludvigsson, J., Leffler, D.A., Bai, J.C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P.H.R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C.P., Leonard, J. N., Aslaksen Lundin, K.E., Murray, J.A., Sanders, D.S., Walker, M.M., Zingone, F. y Ciacci, C. 2013. The Oslo definitios for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62 (1): 43-52.
- Ludwig, D.S. 2018. The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *JAMA*, 287 (18): 2414-2423.
- Ludwig, D.S., Hu, F.B., Tappy, L. y Brand-Miller, J. 2018. Dietary carbohydrates: role of quality and quantity in chronic disease. *BMJ*, 361: k2340.
- Luger, M., Lafontan, M., Bes-Rastrollo, M., Winzer, E., Yumuk, V., Farpour-Lambert, N. Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: a systematic review from 2013 to 2015 and a comparison with previous studies. 2017. *Obesity facts*, 10 (6): 674-693.
- Lupiañez-Barbero, A., González, C. y De Leiva, A. 2018. Tablas y bases de datos de composición de alimentos españolas: necesidad de un referente para los profesionales de la salud. *Endocrinol Diabetes Nutr*, 65 (6): 361-373.
- Llewellyn, A., Simmonds, M., Owen, C.G. y Woolacott, N. 2016. Childhood obesity as a predictor of morbidity in adulthood: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*, 17 (1): 56-67.

- Llorens-Ivorra, C., Quiles-Izquierdo, J., Richart-Martínez, M. y Arroyo-Bañuls, I. 2016. Diseño de un cuestionario para evaluar el equilibrio alimentario de menús escolares. *Rev Esp Nutr Hum Diet*, 20 (1): 40-47.
- Llorens-Ivorra, C., Arroyo-Bañuls, I., Quiles-Izquierdo, J. y Richart-Martínez, M. 2018. Evaluación del equilibrio alimentario de los menús escolares de la Comunidad Valenciana (España) mediante un cuestionario. *Gac Sanit*, 32 (6): 533-538.
- Maçi, R., Bijo, B., Shehu, F. y Memoçi, H. 2016. Isolation of *C. sakazakii* and Concentration of *Enterobacteriaceae* in Kitchen's Neonatal Intensive Care (NIC). *Anglisticum Journal*, 5 (2): 55-59.
- Madrigal, C., Soto-Méndez, M.J., Hernández-Ruiz, Á, Valero, T., Ávila, J.M., Ruiz, E., Lara, F., Leis, R., Martínez de Victoria, E., Moreno, J.M., Ortega, R.M., Ruiz-López, M.D., Varela-Moreiras, G. y Gil, A. 2020. Energy Intake, Macronutrient Profile and Food Sources of Spanish Children Aged One to <10 Years-Results from the EsNuPI Study. *Nutrients*, 12 (4): 893. doi: 10.3390/nu12040893.
- Magalhães, R., Mena, C., Ferreira, V., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P. y Teixeira, P. 2014. Bacteria: *Listeria monocytogenes*. En: Motarjemi, Y. (Ed.), *Encyclopedia of Food Safety*. Academic Press, Waltham, pp. 450-461.
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente). 2009. *Plan de consumo de fruta y verdura en las escuelas*. [en línea]. Disponible en: [http://www.alimentacion.es/es/campanas/consumo\\_fruta\\_verdura\\_escuelas/](http://www.alimentacion.es/es/campanas/consumo_fruta_verdura_escuelas/). [Consulta: 26 mayo 2018].
- Malik, V.S., Pan, A., Willett, W.C. y Hu, F.B. 2013. Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 98:1084-1102.
- Malorny, B., Tassios, P.T., Radstrom, P., Cook, N., Wagner, M. y Hoorfar, J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol*, 83: 39-48.
- Manafi, M. 1996. Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media. *Int J Food Microbiol*, 31: 45-58.
- Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K. y Pal, U.K. 2011. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: An overview. *Am J Food Tech*, 6: 87-102.
- Manera, M. y Salvador, G. 2016. Recomendaciones para la alimentación en la primera infancia (de 0 a 3 años). Pla integral per a la promoció de la salut mitjançant l'alimentació saludable. Generalitat de Catalunya Agència de Salut Pública de Catalunya.
- Marceau, E., Paquette, C., Kurz, K., Friday, C., Langlois, D. y Aweryn, B. 2012. Evaluation and validation of a commercial ELISA-based method for the

- determination of egg protein in foods. *Canadian Food Inspection Agency* [en línea]. Disponible en: [http://www.crystalchem.com/FDA-Egg\\_kit\\_poster.pdf](http://www.crystalchem.com/FDA-Egg_kit_poster.pdf) [Consulta: 22 mayo 2019].
- Martín, G. 1997. Tabla de composición de alimentos (versión 2.1). Madrid: Nutricia.
- Martín-Fernández, B., Costa, J., De los Santos-Álvarez, N., López-Ruiz, B., Oliveira, M.B.P.P. y Mafra, I. 2016. High resolution melting analysis as a new approach to discriminate gluten-containing cereals. *Food Chem*, 211: 383-391.
- Martín-Fernández, B., De los Santos-Álvarez, N., Martín-Clemente, J.P., Lobo-Castañón, M.J. y López-Ruiz, B. 2016. Challenging genosensors in food samples: The case of gluten determination in highly processed samples. *Talanta*, 146, 490-495.
- Martínez, A.B., Caballero-Plasencia, A., Mariscal-Arcas, M., Velasco, J., Rivas, A. y Olea-Serrano, F. 2010. Estudio de los menús escolares servidos en colegios de Granada. *Nutr Hosp*, 25 (3): 394-399.
- Martínez-Tomé, M., Vera, A.M. y Murcia, M.A. 2000. Improving the control of food production in catering establishments with particular reference to the safety of salads. *Food Control*, 11: 437-445.
- Marzano, M.A. y Balzaretto, C.M. 2013. Protecting child health by preventing school-related foodborne illnesses: Microbiological risk assessment of hygiene practices, drinking water and ready-to-eat foods in Italian kindergartens and schools. *Food control*, 34 (2): 560-567.
- Mason, J., Bailes, A., Beda-Andourou, M., Copeland, N., Curtis, T., Deitchler, M., Foster, L., Hensely, M. y Horjus, P. 2005. Recent trends in malnutrition in developing regions: vitamin A deficiency, anemia, iodine deficiency, and child underweight. *Food Nutr Bull*, 26: 59-108.
- Mataix-Verdú, J., Mañas, M., Llopis, J. y Martínez, E. 1993. Tablas de composición de alimentos españoles. Granada: Universidad de Granada.
- Mattarozzi, M. y Careri, M. 2019. The role of incurred materials in method development and validation to account for food processing effects in food allergen analysis. *Anal Bioanal Chem*, 411 (19): 4465-4480.
- Mead, P., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C. y Tauxe, R.V. 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerg Infect Dis*, 5 (5): 607-625.
- MEFP (Ministerio de Educación y Formación Profesional). 2020. Las cifras de la educación en España. Curso 2017-2018 [en línea]. Disponible en: <https://www.educacionyfp.gob.es/dam/jcr:15628203-ffae-435c-a7a0-4abbc390c07b/b2-pdf.pdf> [Consulta: 24 marzo 2020].

- Meldrum, R.J., Mannion, P.T. y Garside J. 2009. Microbiological quality of ready-to-eat food served in schools in Wales, United Kingdom. *J Food Protect*, 72: 197–201.
- Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A.D.M. *et al.* 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*, 77: 1146-1155.
- Micha, R., Shulkin, M.L., Peñalvo, J.L., Khatibzadeh, S., Singh, G.M., Rao, M., Fahimi, S., Powles, J. y Mozaffarian D. 2017. Etiologic effects and optimal intakes of foods and nutrients for risk of cardiovascular diseases and diabetes: systematic reviews and meta-analyses from the Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (NutriCoDE). *PLoS One*, 12: e0175149.
- Michaelsen, K.F., Larnkjaer, A. y Molgaard, C. 2012. Amount and quality of dietary proteins during the first two years of life in relation to NCD risk in adulthood. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 22: 781–786.
- Michaelsen, K.F. y Frank R.G. 2014. Protein needs early in life and long-term health. *Am J Clin Nutr*, 99 (3): 718–722.
- Micó, L., Mañes, J. y Soriano del Castillo, J.M. 2013. Validación de los menús escolares de acuerdo a los estándares recomendados. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 19 (3): 159-165.
- Mills, E.N.C., Adel-Patient, K., Bernard, H., De Loose, M., Gillard, N., Huet, A.C., Larré, C., Nitride, C., Pilolli, R., Tranquet, O., Pouke, C. V. y Monaci, L. 2019. Detection and quantification of allergens in foods and minimum eliciting doses in food-allergic individuals (ThRAII). *J AOAC Int*, 102 (5): 134-1353.
- MISACO (Ministerio de Sanidad y Consumo). 2006. Encuesta Nacional de Salud de España 2006 [en línea]. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuesta2006.htm>. [Consulta: 21 marzo 2020].
- MISACO (Ministerio de Sanidad y Consumo), Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, Ministerio de Educación y Ciencia, Centros de Investigación y Documentación Educativa. 2008. Guía de comedores escolares. Programa PERSEO. ¡Come Sano y muévete! [en línea]. Disponible en: [http://www.sennutricion.org/media/guia08\\_COMEDOR\\_ESCOLAR\\_txt.pdf](http://www.sennutricion.org/media/guia08_COMEDOR_ESCOLAR_txt.pdf) [Consulta: 20 marzo 2020].
- Mohammed, M.A., Sallam, K.I. y Tamura, T. 2015. Prevalence, identification and molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* isolated from retail meat products. *Food Control*, 53: 206-211.
- Monaci L. y Visconti, A. 2009. Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Trend Anal Chem*, 28 (5): 581-591.

- Monaci L. y Visconti, A. 2010. Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trend Food Sci Technol*, 21 (6): 272-283.
- Monaci, L., De Angelis, E., Montemurro, N. y Pilolli, R. 2018. Comprehensive overview and recent advances in proteomics MS based methods for food allergens analysis. *Trend Anal Chem*, 106: 21-36.
- Monroy-Parada, D.X., Prieto-Castillo, L., Ordaz-Castillo, E., Bosqued, M.J., Rodríguez-Artalejo, F. y Royo-Bordonada, M.A. 2019. Mapa de las políticas nutricionales escolares en España. *Gac Sanit*, in press.
- Moore, L.E., Stewart, P.H., y de Shazo, R.D. 2017. Food Allergy: What we know now. *Am J Med Sci*, 353 (4): 353-366.
- Moosavian, S.P., Haghightdoost, F., Surkan, P.J. y Azadbakht, L. 2017. Salt and obesity: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int J Food Sci Nutr*, 68 (3): 265-277.
- Morán, L., Rivera, A., Irlés, J.A., Jiménez, E., González, M.E., Esteban, A., López, G. y Almeida, C. 2013. La planificación del menú escolar; resultado de un sistema de asesoría dietética para la adecuación a las recomendaciones nutricionales. *Nutr Hosp*, 28 (3): 1145-1150.
- Moreiras, O., Carbajal, A. y Cabrera, L. 1992. Tablas de composición de alimentos. Madrid: Eudema S.A.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L. y Cuadrado, C. 2018. Tablas de Composición de Alimentos. Guía de prácticas. 19ª ed. Madrid: Ediciones Pirámide (Grupo Anaya, SA).
- Moreno, F.J. y Pérez-Rendón, J. 2010. Evaluación de menús escolares de Andalucía: manual de ejecución del programa de evaluación. Junta de Andalucía, Consejería de Salud [en línea]. Disponible en: <http://www.junta-deandalucia.es/salud/servicios/contenidos/andaluciaessalud/docs/144/Libro%20men%C3%BAs.pdf>. [Consulta: 17 mayo 2018].
- Mozaffarian, D., Micha, R. y Wallace, S. 2010. Effects on coronary heart disease of increasing polyunsaturated fat in place of saturated fat: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS Med*, 7 (3): e1000252.
- MSCBS (Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social). 2018. Encuesta Nacional de Salud de España 2017 [en línea]. Disponible en: <https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuesta2017.htm> [Consulta: 28 marzo 2020].
- MSCBS (Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social). 2019. Centro de coordinación de alertas y emergencias sanitarias. Informe de fin de seguimiento del brote de listeriosis [en línea]. Disponible en: <https://>

[www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/Informe\\_cierre\\_Listeriosis\\_20190927.pdf](http://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/Informe_cierre_Listeriosis_20190927.pdf) [Consulta: 03 septiembre 2020].

- MSPSI (Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad), Ministerio de Educación, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, Centro Nacional de Innovación e Investigación Educativa. 2010. Documento de consenso sobre la alimentación en los centros educativos [en línea]. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/educanaos/documento\\_consenso.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/educanaos/documento_consenso.pdf). [Consulta: 20 marzo 2020].
- Mullane, N.R, Whyte, P., Wall, P.G., Quinn, T. y Fanning, S. 2007. Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterise and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility. *Int J Food Microbiol*, 116 (1): 73-81.
- Muñoz, M. y Martí, A. 2008. Dieta durante la infancia y la adolescencia. En: Salas-Salvadó, J., Bonada, A., Trallero, R., Saló, M. E. y Burgos, R. Nutrición y Dietética Clínica. (pp. 115-133). Barcelona: Masson.
- Muraro, A., Halken, S., Arshad, S.H., Beyer, K., Dubois, A.E., Du Toit, G., Eigenmann, P.A., Grimshaw, K.E., Hoest, A., Lack, G., O'Mahony, L., Papadopoulos, N.G., Panesar, S., Prescott, S., Roberts, G., de Silva, D., Venter, C., Verhasselt, V., Akdis, A.C. y Sheikh, A. 2014. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines. Primary prevention of food allergy. *Allergy*, 69: 590–601.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A. y Swann, M.B.R. 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J Pathol Bacteriol*, 29 (4): 407–439.
- Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., Fabiani, E., Heier, M., Mcmillan, S., Murray, L., Metzger, M.H., Gasparin, M., Bravi, E. y Mäki, M. 2010. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Annals of Medicine*, 42 (8): 587-595.
- Mustorp, S.L., Dromtorp, S.M. y Holck, A.L. 2011. Multiplex, quantitative, ligation-dependent probe amplification for determination of allergens in food. *J Agric Food Chem*, 59 (10): 5231-5239.
- Nagla, S., Silva, J., Gonçalves, H., Carvalho, K., Sobrinho, S.C. y De Souza, P. 2014. Bacteriological quality and food safety in a Brazilian school food program. *Nutr Hosp*, 29 (1): 80-87.
- NAS (National Academies of Sciences, Engineering and Medicine). 2016. Finding a path to safety in food allergy: assessment of global burden, causes, prevention, management, and public policy. Washington (DC): National Academies of Sciences, Engineering and Medicine.

- Nataro, J.P. y Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11: 142–201.
- Navia, B. y Ortega, R.M. 2006. Ingestas recomendadas de energía y nutrientes. En: Nutriguía. Manual de nutrición en atención primaria. Madrid: Editorial Complutense, p. 3-13.
- NCD-RisC (NCD Risk Factor Collaboration). 2017. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*, 390: 2627–2642.
- Nguz, K., Shindano, J., Samapundo, S. y Huyghebaert A. 2005. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. *Food Control*, 16 (7): 623-628.
- Nwaru, B.I., Erkkola, M., Ahonen, S., Kaila, M., Haapala, A. M., Kronberg-Kippilä, C., Salmelin, R., Veijola, R., Ilonen, J., Simell, O., Knip, M. y Virtanen, S.M. 2010. Age at the introduction of solid foods during the first year and allergic sensitization at age 5 years. *Pediatrics*, 125: 50–9.
- Nwaru, B., Hickstein, L., Panesar, S., Roberts, G., Muraro, A. y Sheikh, A. 2014. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 69 (8): 992-1007.
- Ojeda, P., Ibañez, M.D., Olaguibel, J.M., Sastre, J. y Chivato, T. 2018. Alergológica 2015: A national survey on allergic diseases in the Spanish pediatric population. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 28 (5): 321-329.
- Olaimat, A.N. y Holley, R.A. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiol*, 32 (1): 1-19.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. Report of a Joint OMS/ FAO Expert Consultation. Geneva [en línea]. Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_916.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916.pdf) [Consulta: 22 marzo 2020].
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2004. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. [en línea]. Disponible en: [http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy\\_english\\_web.pdf](http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_english_web.pdf). [Consulta: 8 marzo 2020].
- OMS (Organización Mundial de la Salud) y FAO (Food and Agriculture Organization). 2008. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Microbiological Risk Assessment Series n.º 15. Rome. 90pp.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2013. Plan de Acción Mundial para la Prevención y el Control de las Enfermedades No Transmisibles 2013-2020. Proyecto Revisado y Actualizado [en línea]. Disponible en: [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/15032013\\_updated\\_revised\\_draft\\_action\\_plan\\_spanish.pdf](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/15032013_updated_revised_draft_action_plan_spanish.pdf) [Consulta: 07 marzo 2020].

- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2013a. Ingesta de sodio en adultos y niños [en línea]. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85224/WHO\\_NMH\\_NHD\\_13.2\\_spa.pdf?ua=1&ua=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85224/WHO_NMH_NHD_13.2_spa.pdf?ua=1&ua=1) [Consulta: 18 marzo 2020].
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2015. Nota informativa sobre la ingesta de azúcares recomendada en la directriz de la OMS para adultos y niños [en línea]. Disponible en: [https://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugar\\_intake\\_information\\_note\\_es.pdf](https://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugar_intake_information_note_es.pdf) [Consulta: 13 marzo 2020].
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2016. Informe de la Comisión para acabar con la obesidad infantil [en línea]. Disponible en: [https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA69/A69\\_8-sp.pdf](https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA69/A69_8-sp.pdf) [Consulta: 09 marzo 2020].
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2018a. Alimentación sana [en línea]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet> [Consulta: 13 marzo 2020].
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2018b. Principios de orientación para la alimentación complementaria del niño amamantado [en línea]. Disponible en: [https://www.aeped.es/sites/default/files/1-orientacion\\_para\\_la\\_ac.pdf](https://www.aeped.es/sites/default/files/1-orientacion_para_la_ac.pdf) [Consulta: 21 marzo 2020].
- ONU (Organización de las Naciones Unidas). 1989. A summary of the rights under the Convention on the Rights of the Child [en línea]. Disponible en: [http://www.unicef.org/crc/files/Rights\\_overview.pdf](http://www.unicef.org/crc/files/Rights_overview.pdf) [Consulta: 17 febrero 2020].
- Ortega, R.M., López-Sobaler, A.M., Requejo, A.M. y Andrés, P. 2004. La composición de los alimentos. Herramienta básica para la valoración nutricional. Madrid: Ed. Complutense.
- Ortega, R.M., Aparicio, A., Rodríguez-Rodríguez, E., Bermejo, L. M. Perea, J.M., López-Sobaler, A.M., Ruiz-Roso, B. y Andrés, P. 2008. Preliminary data about the influence of vitamin D status on the loss of body fat in young overweight/obese women following two types of hypocaloric diet. *Br J Nutr*, 100 (2): 269-272.
- Ortega, R.M., Mena, M.C. y Andrés, P. 2010. Vitamina A. En: Gil, A. editor. Tratado de Nutrición (Tomo I). 2ª Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana, p. 547-570.
- Ortega, R.M., Requejo, A.M., Navia, B. y López-Sobaler, A.M. 2014a. Ingestas recomendadas de energía y nutrientes para la población española. En: Ortega, R.M., López-Sobaler, A.M., Requejo, A.M. y Andrés, P. La composición de los alimentos. Herramienta básica para la valoración nutricional. Madrid: Ed. Complutense, 82-85.
- Ortega, R.M., López-Sobaler, A.M., Andrés, P., Requejo, A.M., Aparicio, A. y Molinero, L.M. 2016. Dial software for assessing diets and food calcula-

- tions (for Windows, version 10 Home). Department of Nutrition (UCM) & Alce Ingeniería, S.L. Madrid. Spain [en línea]. Disponible en: <https://www.alceingenieria.net/nutricion/descarga.htm> [Consulta: 13 febrero 2017].
- Ortega, R., López-Sobaler, A., Aparicio, A., Rodríguez-Rodríguez, E., González-Rodríguez, L., Perea, J. y Navia, B. 2014b. Objetivos nutricionales para la población española. Departamento de Nutrición, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.
- Ortiz, C., Valenzuela, R. y Lucero, A.Y. 2017. Celiac disease, non celiac gluten sensitivity and wheat allergy: comparison of 3 different diseases triggered by the same food. *Rev Chil Pediatr*, 88 (3): 417-423.
- Ortiz, J. C., Galan-Malo, P. García-Gálvez, M., Mateos, A., Ortiz-Ramos, M., Razquin, P. y Mata, L. 2018. Survey on the occurrence of allergens on food-contact surfaces from school canteen kitchens. *Food Control*, 84: 449-454.
- Ortiz-Marrón, H., Ortiz-Pinto, M.A., Cuadrado-Gamarra, J.I., Esteban-Vasallo, M., Cortés-Rico, O., Rey-Gallo, L., Ordobás, M. y Galán, I. 2018. Persistence and variation in overweight and obesity among the pre-school population of the Community of Madrid after 2 years of follow-up The ELOIN Cohort. *Rev Esp Cardiol*, 71: 901-908.
- Osimani, A., Aquilanti, L. y Clementi, F. 2015. Evaluation of HACCP System Implementation on the Quality of Mixed Fresh-Cut Salad Prepared in a University Canteen: a case study. *J Environ Health*, 77 (6): 78-84.
- Partearroyo, T., Samaniego-Vaesken, M.L., Ruiz, E., Aranceta-Bartrina, J., Gil, A., González-Gross, M., Ortega, R.M., Serra-Majem, L. y Varela-Moreiras, G. 2019. Sodium intake from foods exceeds recommended limits in the Spanish population: the ANIBES study. *Nutrients*, 11: 2451.
- Paulsen, P., Schopf, E. y Smulders, J.M. 2006. Enumeration of Total Aerobic Bacteria and *Escherichia coli* in Minced Meat and on Carcass Surface Samples with an Automated Most-Probable-Number Method Compared with Colony Count Protocols. *J Food Prot*, 69 (10): 2500-2503.
- Paulsen, P., Borgetti, E., Schopf, E. y Smulders, J.M. 2008. Enumeration of *Enterobacteriaceae* in Various Foods with a New Automated Most-Probable-Number Method Compared with Petrifilm and International Organization for Standardization Procedures. *J Food Prot*, 71 (2): 376-379.
- Peel, M., Donachie, W. y Shaw, A. 1998. Temperature-dependent Expression of Flagella of *Listeria monocytogenes* Studied by Electron Microscopy, SDS-PAGE and Western Blotting. *Microbiology*, 134 (8): 2171-2178.
- Pérez-Rodrigo, C., Gil, A., González-Gross, M., Ortega, R.M., Serra-Majem, L., Varela-Moreiras, G. y Aranceta-Bartrina, J. 2016. Clustering of dietary patterns, lifestyles, and overweight among Spanish children and adolescents in the ANIBES study. *Nutrients*, 8 (1): 11.

- Pérez-Silva, M., Belmonte, S. y Martínez, J. 1998. Estudio microbiológico de los alimentos elaborados en comedores colectivos de alto riesgo. *Rev Esp Salud Pública*, 72 (1): 67-75.
- Perkin, M.R., Logan, K., Tseng, A., Raji, B., Ayis, S., Peacock, J., Brough, H., Marrs, T., Radulovic, S., Craven, J., Flohr, C. y Lack, G. 2016. Randomized Trial of Introduction of Allergenic Foods in Breast-Fed Infants. *N Engl J Med*, 374(18): 1733–1743.
- Petruzzelli, A., Foglini, M., Paolini, F., Framboas, M., Serena, M., Naceur, M. *et al.* 2014. Evaluation of the quality of foods for special diets produced in a school catering facility within a HACCP-based approach: a case study. *Int J Environ Health Res*, 24 (1): 73-81.
- Petruzzelli, A., Osimani, A., Tavoletti, S., Clementi, F., Vetrano, V., Di Lullo, S., Paolini, F., Foglini, M., Micci, E., Oraziotti, N., Luchetti, T. y Tonucci, F. 2018. Microbiological quality assessment of meals and work surfaces in a school-deferred catering system. *Int J Hosp Manag*, 68: 105-114.
- Pettipher, G.L., Watts, Y.B., Langford, S.A. y Kroll, R.G. 1992. Preliminary evaluation of COBRA, an automated DEFT instrument, for the rapid enumeration of microorganisms in cultures, raw-milk, meat and fish. *Lett Appl Microbiol*, 14: 206-209.
- Pietzak, M. 2012. Celiac disease, wheat allergy and gluten sensitivity: When gluten free is not a fad. *J Parenter Enteral Nutr*, 36 (1 Supple): 68-75.
- Pilolli, R., Monaci, L. y Visconti, A. 2013. Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management. *Trend Anal Chem*, 47: 12-26.
- Pirie, J. 1940. *Listeria*: Change of Name for a Genus Bacteria. *Nature*, 145 (264).
- Poms, R.E., Klein, C.L. y Anklam, E. 2004. Methods for allergen analysis in food: review. *Food Additives and Contaminants*, 21 (1): 1-31.
- Poms, R.E., Mills, C. y Popping, B. 2010. MoniQA (Monitoring and Quality Assurance): An EU-funded Network of Excellence (NoE) contributing toward a harmonized approach to food safety management and method validation, including food allergens. *Food Anal Methods*, 3 (4): 389-401.
- Popping, B., Diaz-Amigo, C. y Hoenicke, K. 2010. Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists. Wiley.
- Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J. y Van Amerongen, A. 2009. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem*, 393: 569-582.
- Prieto, M. A. (29-31 de mayo de 2017). Detección de alérgenos: estado actual, retos y necesidades. En *Jornadas de Referencia 2017*. Centro Na-

- cional de Alimentación. Majadahonda (Madrid). [en línea]. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/eventos/2017/5\\_Sesion\\_alergenos\\_Jornada\\_CNA\\_2017\\_.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/eventos/2017/5_Sesion_alergenos_Jornada_CNA_2017_.pdf) [Consulta: 22 enero 2020].
- Ptomey, L.T., Steger, F.L., Schubert, M.M., Lee, J., Willis, E.A., Sullivan, D.K., Szabo-Reed, A.N., Washburn, R.A. y Donnelly, J.E. 2016. Breakfast Intake and Composition Is Associated with Superior Academic Achievement in Elementary Schoolchildren. *J Am Coll Nutr*, 35 (4): 326-33.
- Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P. y Coccolin, L. 2008. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *Int J Food Microbiol*, 121(1): 99–105.
- Rapley, G. 2001. Baby-led weaning: transitioning to solid foods at the baby's own pace. *Community Pract*, 84 (6): 20-23.
- Ray, P., Das, A., Gautman, V., Jain, N., Wig, J. D. y Sharma, M. 2007. Postoperative nosocomial *Enterobacter sakazakii* sepsis. *ANZ J Surg*, 77(10): 915-916.
- Ray, B. y Bhunia, A.K. 2008. Fundamental food microbiology. Fourth Edition. CRC Press, 288-294.
- Reeves, M.W, Evins, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D. y Farmer J. J. 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol*, 27 (2): 313-320.
- Reilly, J.J. y Kelly, J. 2011. Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: Systematic review. *Int J Obes*, 35: 891–898.
- Requejo, A., Ortega, R.M., Carvajales, P., Ruiz, F., Sánchez-Muñiz, F., González-Fernández, M. *et al.* 1995. Tablas de composición de alimentos españoles. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Secretaría General Técnica. Centro de Publicaciones.
- Requejo, A.M. y Ortega, R.M. 2015. Nutrición en la infancia. En: Ortega, R.M. y Requejo A.M., eds. Nutriguía. Manual de Nutrición Clínica en Atención Primaria. Capítulo 4. Madrid: Editorial Panamericana pg. 56-67.
- Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Escámez, P.S.F. y Lindqvist, R. 2018. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*, 16 (1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5134>
- Rijpens, N.P. y Herman, L.M.F. 2002. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. *J AOAC Int*, 85 (4): 984–995.
- Riobó, P. y Bretón, I. 2013. Informe FESNAD sobre la ingesta de ácidos grasos Trans y su importancia en la salud España. FESNAD 2013: 1-20 [en

línea]. Disponible en: [https://www.fesnad.org/resources/files/Publicaciones/Informe\\_grasas\\_trans.pdf](https://www.fesnad.org/resources/files/Publicaciones/Informe_grasas_trans.pdf). [Consulta: 22 marzo 2020].

- Risérus, U., Willett, W.C. y Hu, F.B. 2009. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res*, (48): 44-51.
- Roberts, K.R., Barrett, B.B., Howells, A.D., Shanklin, C.W., Pilling, V.K. y Brannon, L.A. 2008. Food safety training and foodservice employees' knowledge and behavior. *Food prot trends*, 28 (4): 252-260.
- Rodríguez, M., Valero, A., Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Posada, G. y Zurera G. 2011. Hygienic conditions and microbiological status of chilled Ready-To-Eat products served in Southern Spanish hospitals. *Food Control*, 22: 874-882.
- Rodríguez-Caturla, M.Y., Valero, A., Carrasco, E., Posada, G.D., García-Gimeno, R.M. y Zurera G. 2012. Evaluation of hygiene practices and microbiological status of ready-to-eat vegetable salads in Spanish school canteens. *J Sci Food Agric*, 92 (11): 2332-2340.
- Rodríguez-Lázaro, D. y Hernández, M. 2006. Isolation Of *Listeria monocytogenes* DNA From Meat Products For Quantitative Detection By Real-Time Pcr. *J Rapid Methods and Autom Microbiol*, 14(4): 395–404.
- Rodríguez-Rodríguez. E., Navia, B., López-Sobaler, A.M. y Ortega R.M., 2010. Associations between abdominal fat and body mass index on vitamin D status in a group of Spanish schoolchildren. *Eur J Clin Nutr Mar*, 64 (5): 461-467.
- Rodríguez-Urrego, J., Herrera-León, S., Echeita-Sarriondia, A., Soler, P., Simón, F. y Mateo, S. 2010. Nation wide outbreak of *Salmonella* serotype Kedougou associated with infant formula, Spain, 2008. *Euro Surveillance*, 15 (22). 19582.
- Rohde, A., Hammerl, J.A., Boone, I., Jansen, W., Fohler, S., Klein, G., Dieckmann, R. y Al Dahouk, S. 2017. Overview of validated alternative methods for the detection of foodborne bacterial pathogens. *Trends Food Sci Tech*, 62: 113-118.
- Román M.M.A., Tango, M.A., Hernández, C.B. y García, I.A. 2016. *Salmonella* serovar Poona outbreak in a nursery. *Pediatr Aten Primaria*, 18 (69): 35-43.
- Ron, Y., Chen, L., Zhu, T., Song, Y., Yu, M., Shan, Z., Sands, A., Hu, F. B. y Liu, L. 2013. Egg consumption and risk of coronary heart disease and stroke: dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ*, 346: e8539.
- Ros, E., Martínez-González M.A., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., Fitó, M., Martínez, J.A. y Corella, D. 2014. Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. *Adv Nutr*, 5: 330S–336S.

- Ros, E., López-Miranda J., Pico C., Rubio M.A., Babio N., Sala-Vila A., Pérez-Jiménez F., Escrich, E., Bullo M., Solanas, M., Gil, A y Salas-Salvado J. 2015. Consenso sobre las grasas y aceites en la alimentación de la población española adulta; postura de la Federación Española de Sociedades de Alimentación, Nutrición y Dietética (FESNAD). *Nutr Hosp*, 32 (2): 435-477.
- Rossi, S., Scaravelli, E., Germini, A., Corradini, R., Fogher, C. y Marchelli, R. 2006. A PNA-array platform for the detection of hidden allergens in food-stuffs. *Eur Food Res Technol*, 223: 1-6.
- Royo-Bordonada, M.A., Rodríguez-Artalejo, F., Bes-Rastrollo, M., Fernández-Escobar, C., González, C.A., Rivas, F., Martínez-González, M.A., Quiles, J., Bueno-Cavanillas, A., Navarrete-Muñoz, E.M., Navarro, C., López-García, E., Romaguera, D., Suárez-Varela M.M. y Vioque J. 2019. Políticas alimentarias para prevenir la obesidad y las principales enfermedades no transmisibles en España: querer es poder. *Gac Sanit*, 33 (6): 584-592.
- Ryan, M.P., O'Dwyer, J. y Adley, C.C. 2017. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. *BioMed Res Int*, 2017: 3782182.
- Salandra, G., Goffredo, E., Pendarra, C, Nardella, M. y Parisi A. 2008. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance pattern of *Staphylococcus* species isolated from dairy products in southern Italy. *Int J Food Microbiol*, 9: 327-360.
- Saldaña, Z., Sánchez, E., Xicohtencatl-Cortes, J., Puente, J.L. y Girón, J.A. 2011. Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Front Microbiol*, 2: 119.
- Sánchez, H., Ramos, S., López, N., Sánchez, F., Moreno, C y Solís, M. 2019. Políticas alimentarias en las comunidades y ciudades autónomas españolas. Período 2006-2018. *Metas Enferm*, 22 (9): 5-14.
- Sánchez-López, J., García-Moral, A., Gázquez, V., Rubira, N., Valdesoiro, L., Guilarte, M., Depreux, N., Basagaña, M., Soto-Retes, L., De Molina, M., Luengo, O. y Lleónart, R. 2017. Food allergy in Catalonia: Clinical manifestations and its association with airborne allergens. *Allergol Immunopath*, 4 (1): 48-54.
- Sánchez-Vargas, F.M., Abu-El-Haija, M.A. y Gómez-Duarte, O.G. 2011. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis*, 9: 263-277.
- Sánchez-Villegas, A., Pimenta, A.M., Beunza, J.J., Guillen-Grima, F., Toledo, E. y Martínez-Gonzalez, M.A. 2010. Childhood and young adult overweight/obesity and incidence of depression in the SUN project. *Obesity*, 18 (7):1443-8.

- Sancho, P., Cirarda, F.B. y Valcárcel, S. 2015. Características nutricionales de los menús escolares en Bizkaia (País Vasco, España) durante el curso 2012/2013. *Nutr Hosp*, 31: 309-1316.
- Sanderson, K., Patton, G.C., McKercher, C., Dwyer, T. y Venn, A.J. 2011. Overweight and obesity in childhood and risk of mental disorder: a 20-year cohort study. *Aust N Z J Psychiatry*, 45 (5): 384-92.
- Sandrin, T. R., Goldstein, J. E. y Schumaker, S. 2013. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review. *Mass Spectrometry Reviews*, 32: 188-217.
- Sapone, A., Bai, J.C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P.H.R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D. S., Schumann, M., Ullrich, R., Villalta D., Volta, U., Catassi, C. y Fasano, A. 2012. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*, 10: 13-24.
- Savage, J., Sicherer, S. y Wood, R. 2016. The natural history of food allergy. *Allergy Clin Immunol Pract*, 4 (2): 196-203.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L. y Griffin P.M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis*, 17: 7–15.
- Schmid, M., Iversen, C., Gontia, I., Stephan, R., Hofmann, A., Hartmann, A. et al. 2009. Evidence for a plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp. *Res Microbiol*, 160 (8): 608-614.
- Schoemaker, A.A., Sprikkelman A.B., Grimshaw, K.E., Roberts, G., Grabenhenrich, L., Rosenfeld, L., Siegert, S., Dubakiene, R., Rudzeviciene, O., Reche, M., Fiandor, A., Papadopoulos, N.G., Malamitsi-Puchner, A., Fiocchi, A., Dahdah, L., Sigurdardottir, S.T., Clausen, M., Stanczyk-Przyluska, A., Zeman, K., Mills, E.N. McBride, D., Keil, T. y Beyer, K. 2015. Incidence and natural history of challenge-proven cow's milk allergy in European children-EuroPrevall birth cohort. *Allergy*, 70 (8), 963-972.
- Schonenbrucher, V., Mallison, E.T. y Bulte, M. 2008. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* species including three new chromogenic plating media. *Int J Food Microbiol*, 123: 61-66.
- Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Führer, M., Molinelli, A. y Baumgartner, S. 2009. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: An overview. *Anal Bioanal Chem*, 395 (1): 69-81.
- Schuppan, D., Junker, Y. y Barisani, D. 2009. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*, 137 (6): 1912-1933.
- See, K.C., Than, H.A. y Tang, T. 2007. *Enterobacter sakazakii* bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: A case report. *Age Ageing*, 36 (5): 595-596.

- SEEDO/SEEN (Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad/Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición). 2012. El plato para combatir la obesidad [en línea]. Disponible en: <https://www.seen.es/docs/apartados/660/folleto-dia-persona-obesa2012.pdf> [Consulta: 13 marzo 2020].
- Seiquer, I., Haro, A., Cabrera-Vique, C., Muñoz-Hoyos, A. y Galdó, G. 2016. Evaluación nutricional de los menús servidos en las escuelas infantiles municipales de Granada. *An Pediatr*, 85 (4):197-203.
- Serra, L. y Aranceta, J. 2011. Objetivos nutricionales para la población española. Consenso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria 2011. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 17 (4): 178-199.
- Serra-Majem, L., Ribas-Barba, L., Aranceta-Bartrina, J., Perez-Rodrigo, C., Saavedra, P. y Peña, L. 2006. Prevalence and determinants of obesity in Spanish children and young people. *Br J Nutr*, 96: 67S–72S.
- Settanni, L. y Corsetti, A. 2007. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food and beverage associated microorganisms: a review. *J Microbiol Methods*, 69: 1-22.
- Sewell, A.M., Warburton, D.W. Boville, A. Daley, E.F. y Mullen K. 2003. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. *Int J Food Microbiol*, 81: 123-129.
- Shaw, R.K., Berger, C.N., Feys, B., Knutton, S., Pallen, M.J. y Frankel G. 2008. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* exploits EspA filaments for attachment to salad leaves. *Appl Environ Microbiol*, 74: 2908–2914.
- Sicherer, S.H. y Sampson, H.A. 2018. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention and management. *J Allergy Clin Immunol*, 141: 41-58.
- Simmons, B.P., Gelfand, M.S., Haas, M., Metts, L. y Ferguson, J. 1989. *Enterobacter sakazakii* Infections in Neonates Associated with Intrinsic Contamination of a Powdered Infant Formula. *Infect Control and Hosp Epidemiol*, 10 (9): 398.
- Sinha, R., Cross, A., Graubard, B., Leitzmann, M. y Schatzkin, A. 2009. Meat intake and mortality: a prospective study of over half a million people. *Arch Intern Med*, 169 (6): 562-571.
- Skinner, A.C., Perrin, E.M., Moss, L.A. y Skelton, J.A. 2015. Cardiometabolic risks and severity of obesity in children and young adults. *N Engl J Med*, 373: 1307–1317.
- Slowianek, M. y Majak, I. 2011. Methods of allergen detection based on DNA analysis. *Biotechnol Food Sci*, 75 (2): 39-44.
- Soares, K., Moura, A.T., García-Díez, J., Oliveira, I., Esteves, A. y Saraiva, C. 2020a. Evaluation of Hygienic Quality of Food Served in Universities Canteens of Northern Portugal. *Indian J Microbiol*, 60 (1): 107-114.

- Soares, P., Martínez-Milán, M.A., Comino, I., Caballero, P. y Davó-Blanes, M.C. 2020b. Valoración del documento de consenso sobre alimentación en centros educativos para evaluar menús escolares. *Gac Sanit*, 34 (3): 225-229.
- Solomon, E.B., Yaron, S. y Matthews, K.R. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl Environ Microbiol*, 68: 397-400.
- Stritt, A., Tschumi, S., Kottanattu, L., Bucher, B.S., Steinmann, M., von Steiger, N., Stephan, R., Hächler, H. y Simonetti G.D. 2013. Neonatal hemolytic uremic syndrome after mother-to-child transmission of a low-pathogenic stx2b harboring Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis*, 56: 114–116.
- Sun, X., Guan, L., Shan, X., Zhang, Y. y Li, Z. 2012. Electrochemical detection of peanut allergen Ara h 1 using a sensitive DNA biosensor based on Stem-Loop probe. *J Agric Food Chem*, 60 (44): 10979-10984.
- Swaminathan, B. y Gerner-Smidt, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*, 9 (10): 1236–1243.
- Szajewska H., Shamir, R., Mearin, L., Ribes-Koninckx, C., Catassi, C., Domellöf, M., Fewtrell, M. S., Husby, S., Papadopoulou, A., Vandeplass, Y., Castillejo, G., Kolacek, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I., Lionetti, E., Polanco, I. y Troncone, R. 2016. Gluten introduction and the risk of coeliac disease: a position paper by the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 62: 507–13.
- Taylor, S.L., Nordlee, J.A. y Niemann, L.M. 2009. Allergen immunoassays: Considerations for use of naturally incurred standards. *Anal Bioanal Chem*, 395: 83-92.
- Te Morenga, L., Mallard, S. y Mann, J. 2013. Dietary sugars and body weight: Systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. *BMJ*, 346: e7492.
- Thacker, J.D., Casale, E.S. y Tucker, C.M. 1996. Immunoassays (ELISA) for rapid, quantitative analysis in the food-processing industry. *J Agric Food Chem*, 44: 2680-2685.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R. y Wood, R. 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*, 74 (5): 835-855.
- Tindall, B.J., Grimont, A.D., Garrity, G.M. y Euzéby, J.P. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55 (1): 521-524.

- Todar, K. 2008. Todar's online Textbook of Bacteriology [en línea]. Disponible en: <http://textbookofbacteriology.net/> [Consulta: 30 mayo 2020].
- Todd, E.C.D., Greig, J.D., Bartleson, C.A. y Michaels, B.S. 2009. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. *J Food Prot*, 72 (1): 202-219.
- Tonnuci, F., Cenci, T., Casiere, A., Petruzzelli, A., Migliazzo, A., Montagna, C. *et al.* 2005. Progetto di collaborazione tra gli Istituti Zooprofilattici: limiti di riferimento per la ristorazione collettiva (Collaborative project between the Istituti Zooprofilattici: reference limits for catering). Atti XV Convegno nazionale AIVI 2005; 351-356.
- Tóth, A.J., Szakmár, K., Dunay, A., Illés, C.B. y Bittsánszky, A. 2018. Hygiene assessments of school kitchens based on the microbiological status of served food. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 17 (2): 159-168.
- Townsend, D.E. y Naqui, A. 1998. Comparison of SimPlate™ Total Plate Count Test with Plate Count Agar Method for Detection and Quantitation of Bacteria in Food. *J AOAC Int*, 81 (3): 563-569.
- Trafialek, J., Domańska, A. y Kolanowski. 2019. Analysis of food safety compliance in Warsaw nurseries. *Food Control*, 96: 421-431.
- Tran, D.T., Janssen, K.P.F., Pollet, J., Lammertyn, E., Anné, J., Van Schepdael, A. y Lammertyn, J. 2010. Selection and characterization of DNA aptamers for egg white lysozyme. *Molecules*, 15 (3): 1127-1140.
- Tran, D.T., Knez, K., Janssen, K.P.F., Pollet, J., Spasic, D. y Lammertyn, J. 2013. Selection of aptamers against Ara h 1 protein for FO-SPR biosensing of peanut allergens in food matrices. *Biosens Bioelectron*, 43: 245-251.
- Tye-Din, J.A., Galipeau, H.J. y Agardh, D. 2018. Celiac disease: A review of current concepts in pathogenesis, prevention and novel therapies. *Front Pediatr*, 6 (350): 1-19.
- UE (Unión Europea). 2007. Libro Blanco: estrategia europea sobre problemas de salud relacionados con la alimentación, el sobrepeso y la obesidad [en línea]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2007:0279:FIN:ES:PDF> [Consulta: 21 marzo 2020].
- UE (Unión Europea). 2014. Action Plan on Childhood Obesity 2014-2020 [en línea]. Disponible en: [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/nutrition\\_physical\\_activity/docs/childhoodobesity\\_actionplan\\_2014\\_2020\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/nutrition_physical_activity/docs/childhoodobesity_actionplan_2014_2020_en.pdf) [Consulta: 21 marzo 2020].
- UE (Unión Europea). 2019. The Rapid System for Food and Feed 2018 Annual Report. Luxembourg: Publications Office of the European Union, [en

línea]. Disponible en: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff\\_annual\\_report\\_2018.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2018.pdf) [Consulta: 29 diciembre 2019].

- Ueda, S. 2017 Occurrence of *Cronobacter* spp. in dried foods, fresh vegetables and soil. *Biocontrol Sci*, 22 (1): 55–59.
- UNE-EN ISO 6579-1:2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella* spp.
- UNE-EN ISO 11290-2:2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. Parte 2: Método de recuento.
- UNE-EN ISO 22964:2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección de *Cronobacter* spp.
- UNE-EN ISO 7218:2008/A1:2013. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico.
- Unterberger, C., Luber, F., Demmel, A., Grünwald, K., Huber, I., Engel, K.H. y Busch, U. 2014. Simultaneous detection of allergenic fish, cephalopods and shellfish in food by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Eur Food Res Technol*, 239 (4): 559-566.
- Urusov, A.E., Zherdev, A.V. y Dzantiev, B.B. 2019. Towards lateral flow quantitative assays: Detection approaches. *Biosensors*, 9 (3): 1-16.
- Valero, T. 2017. Programa de comedores escolares de la Comunidad de Madrid: evolución de la normativa y evaluación dietética del menú escolar (2007-2014) (Tesis doctoral). Universidad CEU San Pablo. Madrid.
- Vaquero, L., Rodríguez-Martín, L., León, F., Jorquera, F. y Vivas, S. 2018. Nuevas terapias en la enfermedad celíaca y sus complicaciones. *Gastroenterol Hepatol*, 41 (3): 191-204.
- Van Acker, J., De Smet, F., Muyldermans, G., Bougatef, A., Naessens, A. y Lauwers, S. 2001. Outbreak of Necrotizing Enterocolitis Associated with *Enterobacter sakazakii* in Powdered Milk Formula. *J Clin Microbiol*, 39 (1): 293-297.
- Van Eckert, R., Bond, J., Rawson, P., Klein, C.L., Stern, M. y Jordan, T.W. 2010. Reactivity of gluten detecting monoclonal antibodies to a gliadin reference material. *J Cereal Sci*, 51 (2): 189-204.
- Van Griethuysen, A., Bes, M., Etienne, J. Zbinden, R. y Kluytmans, J. 2001. International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 39: 86-89.
- Vasconcellos, L., Carvalho, C.T., Tavares, R.O., De Mello, V., De Oliveira, C., Silva J.N., Dos Reis S.M., Forsythe, S.J. y Brandao, M.L.L. 2018. Isolation, molecular and phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. in

- ready-to-eat salads and foods from Japanese cuisine commercialized in Brazil. *Food Res Int*, 107: 353-359.
- Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C.E.R., Rees, C.E.D. y Waites, W.M. 2000. Effect of Flagella on Initial Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel. *Appl Environ Microbiol*, 66 (2): 860-863.
- Vázquez C. 2017. Ingestas dietéticas de referencia, objetivos nutricionales y guías alimentarias. En: Royo-Bordonada, M.A. (coord.). Nutrición en Salud Pública. Capítulo 3. Madrid: Escuela Nacional de Sanidad, Instituto de Salud Carlos III.
- Veal, D.A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J. y Attfielsd, P.V. 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J Immunol Method*, 243: 191-210.
- Veras, J.F., Simeao, L., Tong, L.C., Shupp, J.W., Cummings, C., Aparecida, D., Oliveira, M.M., Cantini, A., Nicoli, J.R. y Jett, M. 2008. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int J Infect Dis*, 12: 410-415.
- Vergara, D., Ríos-Reina, R., Úbeda, C., Escudero-Gilete, M.L. y Callegón, R.M. 2016. Menús ofertados en centros de educación infantil de Sevilla: adecuación a criterios nutricionales y a las recomendaciones dietéticas. *Nutr Hosp*, 33 (3): 671-677.
- Virtanen, J.K., Mursu, J., Tuomainen, T.P., Virtanen, H.E. y Voutilainen, S. 2015. Egg consumption and risk of incident type 2 diabetes in men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nutr*, 101 (5): 1088-1096.
- Vojkowska, H., Karpiskova, R., Orieskova, M. y Drahovska, H. 2016. Characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food of plant origin and environmental samples collected from farms and from supermarkets in the Czech Republic. *Int J Food Microbiol*, 217: 130-136.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. y Whitman, W.B. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2<sup>nd</sup> Ed. Volume 3: The Firmicutes [Internet]. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Vos, M.B., Kaar, J.L., Welsh, J.A., Van Horn, L.V., Feig, D.I., Anderson, C.A.M, Patel, M.J., Cruz Munos, J., Krebs, N.F., Xanthakos, S.A. y Johnson, R.K. 2017. Added Sugars and Cardiovascular Disease Risk in Children. *Circulation*, 135 (19): e1017-e1034.
- Vriezinga, S.L., Schweizer, J.J., Koning, F. y Mearin, L. 2015. Coeliac disease and gluten-related disorders in childhood. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12 (9): 527-536.

- Wang, X., Ouyang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhao, G., Bao, W. y Hu, F. B. 2014. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies *BMJ*, 349: g4490.
- WCRF (World Cancer Research Fund). 2018. Diet, nutrition, physical activity and cancer: a global perspective. Continuous Update Project Expert Report [en línea]. Disponible en: <https://www.wcrf.org/sites/default/files/Summary-of-Third-Expert-Report-2018.pdf> [Consulta: 07 marzo 2020].
- Weaver, C.M. 2014. How sound is the science behind the dietary recommendations for dairy?. *Am J Clin Nutr*, 99 (5 Suppl): 1212-1222.
- Wei, H., Gao, Z., Liang, R., Li, Z., Hao, H. y Liu, X. 2016. Whole-grain consumption and the risk of all-cause, CVD and cancer mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Br J Nutr*, 116 (3): 514-25.
- Weiss, T., Lacorn, M., Flannery, J., Benzinger, M.J., Bird, P., Crowley, E.S., Goins, D. y Agin, J.R. 2016. Validation of the RIDASCREEN® FAST Milk kit AOAC Performance Tested Method (SM) 101501. *J AOAC Int*, 99 (2): 495-503.
- Wiedmann, M., Wang, S., Post, L. y Nightingale, K. 2014. Assessment Criteria and Approaches for Rapid Detection Methods To Be Used in the Food Industry. *J Food Prot*, 77 (4): 670–690.
- Williams, C.L. 1995. Importante of dietary fiber in childhood. *J Am Diet Assoc*, 10: 1140-1149.
- Williams, A.P., McGregor, K.A., Killham, K. y Jones, D.L. 2008. Persistence and metabolic activity of *Escherichia coli* O157:H7 in farm animal faeces. *Fems Microbiol Lett*, 287: 168–173.
- Wright, D.J. Chapman, P.A. y Siddons, C.A. 1994. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. *Epidemiol Infect*, 113: 31-39.
- Xepapadaki, P., Fiocchi, A., Grabenhenrich, L., Roberts, G., Grimshaw, K.E., Fiandor, J., Sigurdardottir, S., Clausen, M., Papadopoulos, N.G., Dahdah, L., Mackie, A., Sprickelman, A.B., Schoemaker, A.A., Dubakiene, R., Butiene, I., Kowalski, M.L., Zeman, K., Gavrili, S., Keil, T. y Beyer, K. 2016. Incidence and natural history of hen's egg allergy in the first 2 years of life-the EuroPrevall birth cohort study. *Allergy*, 71 (3): 350-357.
- Xu, X., Li, C., Wu, Q., Zhang, J., Huang, J. y Yang, G. 2015. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods. *Int J Food Microbiol*, 204: 17-23.
- Yang, K. y Bashir, R. 2008. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnol Adv*, 26 (2): 135-150.

- Yong W., Guo B., Shi X., Cheng T., Chen M., Jiang X., Ye, Y., Wang, J., Xie, G. y Ding, J. 2018. An investigation of an acute gastroenteritis outbreak: *Cronobacter sakazakii*, a potential cause of food-borne illness. *Front Microbiol*, 9: 2549.
- Yoosuf, S. y Makharia, G.K. 2019. Evolving therapy for celiac disease. *Front Pediatr*, 7 (193): 1-18.
- Younus, M., Hartwick, E., Siddiqi, A.A., Wilkins, M., Davies, H.D., Rahbar, M., Funk, J. y Saeed, M. 2007. The role of neighborhood level socioeconomic characteristics in *Salmonella* infections in Michigan (1997-2007): assessment using geographic information system. *Int J Health Geogr*, 6 (56).
- Zaragoza-Martí, A. y Contreras, E. 2020. Influencia de la ingesta de alimentos o grupos de alimentos en la aparición y/o protección de los diversos tipos de cancer: revision sistemática. *Nutr Hosp*, 37 (1): 169-192.
- Zulueta, B., Irastorza, I.X., Oliver, P., García, Z. y Vitoria, J.C. 2011. Perfil nutricional de los menús e ingesta dietética en comedores escolares de Vizcaya. *Nutr Hosp*, 26 (5): 1183-1187.



## REFERENCIAS LEGALES

---



## REFERENCIAS LEGALES

- Reglamento (UE) 2019/649 de la Comisión de 24 de abril de 2019 que modifica el anexo III del Reglamento (CE) n.º 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las grasas trans, que no sean las grasas trans presentes de forma natural en las grasas de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 110/17, de 25 de abril de 2019.
- Reglamento Delegado (UE) n.º 78/2014 de la Comisión de 22 de noviembre de 2013 que modifica los anexos II y III del Reglamento (UE) no 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, por lo que se refiere a determinados cereales que causan alergias o intolerancias y alimentos con fitosteroles, ésteres de fitosterol, fitostanoles o ésteres de fitostanos añadidos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 27, de 30 de enero de 2014.
- Reglamento de Ejecución (UE) n.º 828/2014 de la Comisión de 30 de julio de 2014 relativo a los requisitos para la transmisión de información a los consumidores sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 228/5, de 31 de julio de 2014.
- Reglamento (UE) n.º 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) no 1924/2006 y (CE) no 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) no 608/2004 de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 304, de 22 de noviembre de 2011.
- Reglamento (CE) n.º 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) No 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 332, de 7 de diciembre de 2007.
- Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338, de 22 de diciembre de 2005.
- Reglamento (CE) n.º 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*, L 139, de 30 de abril de 2004.

- Reglamento (CE) n.º 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*, L 31/1, de 1 de febrero de 2002.
- Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición. *Boletín Oficial del Estado*, n.º 160, de 6 de julio de 2011.
- Real Decreto 126/2015, de 27 de febrero, por el que se aprueba la norma general relativa a la información alimentaria de los alimentos que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por los titulares del comercio al por menor. *Boletín Oficial del Estado*, n.º 54, de 4 de marzo de 2015.
- Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. *Boletín Oficial del Estado*, n. 11, de 12 de enero de 2001.
- Orden Ministerial 11/2013, de 19 de febrero, sobre actuaciones en materia de higiene y seguridad alimentaria en el ámbito de las Fuerzas Armadas. *Boletín Oficial del Estado* n.º 40, de 26 de febrero de 2013.
- Resolución de 8 de febrero de 2019, de la Secretaría General de Sanidad y Consumo, por la que se publica el Convenio entre la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición y la Asociación Nacional de Grandes Empresas de Distribución, para el desarrollo de los acuerdos del plan de colaboración para la mejora de la composición de los alimentos y bebidas y otras medidas 2017-2020. *Boletín Oficial del Estado*, n. 62, de 13 de marzo de 2019.
- Instrucción Técnica Sanitaria 01/2014, de 25 de febrero, normas relativas a las inspecciones de seguridad alimentaria en el ámbito de la Defensa. Inspección General de Sanidad de la Defensa.

**ANEXO**

---



## Control microbiológico de las comidas servidas en centros de educación infantil del Ministerio de Defensa durante el año 2017

Lozano Benito D.<sup>1</sup>, Rípodas Navarro A.<sup>2</sup>, Fernández-Moreira D.<sup>3</sup>, Bayarri Fernández S.<sup>4</sup>, Lázaro Gistau R.<sup>4</sup>, Zamora Benito A.<sup>5</sup>

*Sanid. mil.* 2019; 75 (1): 7-13, ISSN: 1887-8571

### RESUMEN

**Introducción:** La población infantil es más vulnerable a las enfermedades de transmisión alimentaria que otros grupos demográficos. En los últimos años se han notificado brotes de enfermedades de origen alimentario en guarderías causados por agentes patógenos como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* o *Cronobacter sakazakii*. **Objetivos:** Determinar la calidad microbiológica de las comidas servidas en los comedores de las guarderías en relación con los criterios de seguridad alimentaria y de higiene de los procesos. **Materiales y Métodos:** Se analizaron 241 muestras del menú de iniciación y del menú completo en 13 guarderías. Se investigó la presencia de *Salmonella* spp. y *Cronobacter* spp. y se realizó el recuento de *L. monocytogenes* y de los microorganismos indicadores de la higiene de los procesos (aerobios mesófilos, enterobacterias totales, coliformes totales, *Escherichia coli* β-glucuronidasa positivos y *Staphylococcus aureus*). **Resultados:** *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* no se detectaron en ninguna de las muestras analizadas. *Cronobacter* spp. se aisló en la guarnición de ensalada de un segundo plato. *E. coli* no se detectó en ninguna muestra y para el resto de indicadores de higiene las prevalencias fueron las siguientes: aerobios mesófilos 36,10 %, enterobacterias 13,28 %, coliformes totales 7,47 % y *S. aureus* 4,14 %. El grupo de frutas fue siempre el que presentó mayor prevalencia en todos los parámetros, seguido por los segundos platos debido principalmente a la presencia de ensaladas en la guarnición. **Conclusiones:** Conforme a los resultados microbiológicos obtenidos, se considera que las comidas servidas tienen un alto grado de calidad microbiológica.

**PALABRAS CLAVE:** Calidad microbiológica, Guarderías, Seguridad alimentaria.

### Microbiological Control of the Food Served in Children's Education Centres of the Ministry of Defense in 2017

**SUMMARY: Introduction:** Infants and children are more vulnerable to foodborne illnesses than other demographic population. In recent years, foodborne outbreaks have been reported in kindergartens because of the presence of pathogenic agents like *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Cronobacter sakazakii*. **Objective:** To determine the microbiological quality of foods ready for consumption in kindergarten foodservices regarding food safety and process hygiene criteria. **Materials and Methods:** 241 food samples from the initiation menu and full menu were analyzed in 13 kindergartens. *Salmonella* spp. and *Cronobacter* spp. were investigated and an enumeration of *L. monocytogenes* and of the hygiene indicator microorganisms (mesophilic aerobes, enterobacteriaceae, β-glucuronidase positive *Escherichia coli*, total coliforms and *Staphylococcus aureus*) was carried out. **Results:** No *Salmonella* spp. or *L. monocytogenes* were isolated from any of the samples. *Cronobacter* spp. was isolated in the fresh salad of a second plate. *E. coli* was not detected in any sample and the results shown in the rest of the hygiene indicators were the following: mesophilic aerobes 36,10 %, enterobacteriaceae 13,28 %, total coliforms 7,47 % and *S. aureus* 4,14 %. The fruits group was always the one that showed the highest prevalence in all the parameters, followed by the second courses mainly due to the presence of fresh salads. **Conclusions:** According to the microbiological results obtained, it is considered that the meals served have a high level of microbiological quality.

**KEYWORDS:** Microbiological quality, Kindergarten, Food safety.

<sup>1</sup> Cte. Veterinario. Academia Central de la Defensa. Escuela Militar de Sanidad. Madrid.

<sup>2</sup> Cap. Veterinario. Centro Militar de Veterinaria. Servicio de Bromatología e Higiene de los Alimentos. Madrid.

<sup>3</sup> Civil. Doctor en Farmacia. Centro Militar de Veterinaria. Servicio de Bromatología e Higiene de los Alimentos. Madrid.

<sup>4</sup> Civil. Doctora en Veterinaria. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2-Zaragoza-CITA.

<sup>5</sup> Tcol. Veterinario. Centro Militar de Veterinaria. Servicio de Bromatología e Higiene de los Alimentos. Madrid.

**Dirección para correspondencia:** Diego Lozano Benito. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa (Servicio de Bromatología e Higiene de los Alimentos). Dario Gazapo 3. 28025, Madrid. Telf.: 917111306. dlozben@et.mde.es

Recibido: 11 de abril de 2018

Aceptado: 19 de junio de 2018

doi: 10.4321/S1887-85712019000100002

### INTRODUCCIÓN

Según Buzby (2001)<sup>1</sup>, la población infantil es más vulnerable a las enfermedades de transmisión alimentaria que otros grupos demográficos, debido al desarrollo parcial del sistema inmune y a un menor peso corporal que reduce la dosis infectiva necesaria para provocar la enfermedad. Así lo demuestra la notificación de diferentes brotes de origen alimentario en lactantes y niños de corta edad causados por bacterias patógenas como *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* o *C. sakazakii*<sup>2,3,4,5</sup>.

La normativa europea establece los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Por un lado, fija criterios microbiológicos para la seguridad de los alimentos, y por otro,

Lozano Benito D., et. al.

criterios microbiológicos que definen la aceptabilidad del proceso<sup>6</sup>. El estudio realizado por Aguirre y Aguirre (2013)<sup>7</sup> en centros infantiles asturianos, resaltaba la escasez de investigaciones para evaluar la calidad microbiológica de las comidas servidas en comedores escolares.

La Ley 17/2011 de seguridad alimentaria y nutrición, establece que serán los órganos sanitarios competentes del Ministerio de Defensa, los que apliquen sus disposiciones cuando éstas afecten a las unidades, centros y dependencias pertenecientes al Ministerio de Defensa<sup>8</sup>. Actualmente hay 25 centros de educación infantil (CEI) dependientes del Ministerio de Defensa, acogiendo a 1.222 niños de edades comprendidas entre los 6 meses y 3 años (primer ciclo de educación infantil).

Todo lo expuesto anteriormente, demuestra la conveniencia de realizar analíticas de control microbiológico de las comidas servidas a la población infantil. Por tanto, el objetivo principal de este estudio es determinar la calidad microbiológica de las comidas servidas en los comedores de los CEI adscritos al Ministerio de Defensa, teniendo en cuenta los criterios microbiológicos de seguridad alimentaria e higiene de los procesos establecidos por la legislación. Otros objetivos específicos son evaluar la influencia del tipo de alimento, del tratamiento térmico recibido y del modelo de gestión.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional transversal sobre los platos servidos en los CEI del Ministerio de Defensa. La totalidad de los CEI de los que se tomaron muestras estaban adjudicados a una única empresa que gestionaba de manera integral la alimentación, ya fuera elaborando las comidas en las propias cocinas de las guarderías (gestión directa) o mediante la contratación de un catering (gestión contratada).

El oficial veterinario asignado a cada CEI, cumpliendo el cronograma de una campaña de control oficial, realizó un muestreo no probabilístico consecutivo durante 5 días del menú de iniciación a base de purés y del menú completo formado por un primer plato, segundo plato y postre.

A su vez, estos platos podían haber sufrido un tratamiento térmico (grupo A) o ser comidas preparadas sin tratamiento térmico o que al menos alguno de sus ingredientes no hubiera sido tratado térmicamente (grupo B).

Se han analizado un total de 241 muestras, procedentes de 8 CEI que disponen de cocina propia y 5 CEI con catering (Tabla 1).

En la Tabla 2 se recogen los métodos analíticos utilizados para cada microorganismo analizado, para los cuales se utilizaron técnicas de microbiología tradicional y automatizada basadas en procedimientos acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), a excepción de la investigación de *Cronobacter* spp.

**Tabla 2.** Métodos analíticos utilizados para cada parámetro.

Método analítico	Parámetro analizado
ISO 6579:2002 y VIDAS® SLM	Investigación <i>Salmonella</i> spp.
ISO 11290:2017 y VIDAS® LMO2	Detección y recuento <i>L. monocytogenes</i>
ISO 22964:2017 y PCR Tiempo Real	Investigación <i>Cronobacter</i> spp.
TEMPO® AC	Recuento Aerobios mesófilos
TEMPO® EB	Recuento Enterobacterias totales
TEMPO® TC	Recuento Coliformes totales
TEMPO® EC	Recuento <i>E. coli</i> β-glucuronidasa +
TEMPO® STA	Recuento <i>S. aureus</i>

Para la investigación de *Salmonella* spp. se empleó el sistema automatizado VIDAS®, que consiste en un inmunoensayo enzimático que detecta antígenos de *Salmonella* mediante la técnica ELFA (ensayo de fluorescencia ligado a enzima). Para el recuento de microorganismos indicadores de calidad higiénica se utilizó el sistema automatizado TEMPO®, que estima la cantidad de microorganismos basándose en la técnica del número más probable. A partir de la dilución inicial (1/10: 25 g representativos de la muestra en 225 ml de agua de peptona tamponada), se preparó una dilución 1/400 en el caso de TEMPO® AC y de 1/40 en el resto de microorganismos.

Para la investigación de *Cronobacter* spp. se siguió el método horizontal descrito en la ISO 22964:2017 con la modificación de la fase de confirmación en la que se utilizó la técnica de PCR a tiempo real. Las colonias sospechosas de *Cronobacter* spp. se confirmaron con el Thermo Scientific™ SureTect™ *Cronobacter* spp. PCR Assay, certificado por NF VALIDATION siguiendo el protocolo de validación de la norma ISO 16140.

Para el estudio estadístico descriptivo todos los recuentos microbiológicos se transformaron a logaritmos y se analizaron las medias, desviaciones estándar y rangos mediante Microsoft Excel (2013).

**Tabla 1.** Número de muestras analizadas según el tipo de gestión, plato y tratamiento.

	A		B		TOTAL
	GD	GC	GD	GC	
Primer plato	36	25	4	-	65
Segundo plato	35	18	3	7	63
Fruta	-	-	35	14	49
Purés	39	25	-	-	64
<b>TOTAL</b>	<b>110</b>	<b>68</b>	<b>42</b>	<b>21</b>	<b>241</b>

GD: Gestión directa. GC: gestión contratada. A: comidas preparadas con tratamiento térmico. B: comidas preparadas sin tratamiento térmico o con tratamiento térmico que lleva algún ingrediente no sometido a tratamiento térmico.

Control microbiológico de las comidas servidas en centros de educación infantil del Ministerio de...

**RESULTADOS**

Las bacterias patógenas *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* no se detectaron en ninguna de las muestras analizadas. No obstante, *Cronobacter* spp. se aisló y confirmó en la guarnición (ensalada de lechuga y maíz) de un segundo plato de merluza en salsa.

Respecto a los microorganismos indicadores de la higiene de los procesos, la Tabla 3 muestra los recuentos y prevalencias de cada uno de ellos en las 241 muestras analizadas. Se consideraron positivas las muestras cuyos recuentos superaron los límites inferiores de cuantificación del sistema automatizado TEMPO® para cada tipo de ensayo (100 UFC/g para AM y 10 UFC/g para el resto de microorganismos).

En la Tabla 4 se reflejan las prevalencias obtenidas para los microorganismos aerobios mesófilos (AM), *E. coli* (EC) enterobacterias totales (EB), coliformes totales (CT) y *S. aureus* (STA), según el tipo de plato.

EC no se detectó en ninguna muestra, mientras que los AM mostraron la mayor prevalencia (36,10 %), destacando que más de la mitad de las frutas fueron positivas (53,06 %). Le siguieron en porcentaje los segundos platos y purés prácticamente con el mismo porcentaje (34,92 % y 34,37 %, respectivamente). Respecto a los primeros platos, aproximadamente la cuarta parte

(26,15 %) presentaron recuentos de AM superiores al límite de cuantificación.

El 13,28 % de las muestras analizadas resultaron positivas para EB, siendo de nuevo las frutas las que mostraron el mayor porcentaje (34,69 %). El recuento positivo fue bajo en los primeros platos y en los purés (6,15 % y 3,12 %, respectivamente) y algo mayor en los segundos platos (14,28 %).

La prevalencia de CT fue de un 7,47 %, volviendo a ser las frutas las que mostraron el porcentaje más alto (14,28 %). Un total de siete frutas resultaron positivas, el mismo número que para los segundos platos, lo que supuso un 11,11 % del total. En los primeros platos y en los purés el porcentaje de muestras positivas fue 3,08 % y 3,12 %, respectivamente.

Finalmente, STA solo se aisló en 10 muestras, concretamente en tres piezas de frutas, tres purés, dos primeros platos y dos segundos platos.

En la Tabla 5, se muestran los resultados correspondientes a los alimentos según el tratamiento térmico al que fueron sometido (grupo A y grupo B). La prevalencia de todos los microorganismos estudiados fue superior en los alimentos del grupo B: 58,73 % para AM, 42,86 % para EB, 23,81 % para CT y 6,34 % para STA.

Por último, en la Tabla 6 se comparan los modelos de gestión, 8 CEI con cocina central frente a 5 CEI con cocina catering. Se

**Tabla 3.** Recuentos (Log UFC/g) de microorganismos indicadores de la higiene del proceso.

	Muestras positivas (n)	Prevalencia (%)	Media (DE)	Mínimo- Máximo
AM	87	36,10	2,87 (0,89)	2,00-5,69
EB	32	13,28	2,38 (1,21)	1,00-4,69
EC	0	0	-	-
CT	18	7,47	2,42 (1,25)	1,00-4,69
STA	10	4,14	1,19 (0,16)	1,00-1,32

DE: desviación estándar.

AM: aerobios mesófilos. EB: enterobacteriáceas. EC: *E. coli*. CT: coliformes totales. STA: *S. aureus*.

**Tabla 4.** Recuentos (Log UFC/g) de microorganismos indicadores de la higiene de los procesos según el tipo de plato.

	Microorganismo	Muestras positivas (n)	Prevalencia (%)	Media (DE)	Mínimo-Máximo
Primer plato (n= 65)	AM	17	26,15	2,72 (0,78)	2,00-4,08
	EB	4	6,15	1,43 (0,34)	1,00-1,77
	EC	0	0	-	-
	CT	2	3,08	1,00 (0,00)	1,00-1,00
	STA	2	3,07	1,32 (0,00)	1,32
Segundo plato (n = 63)	AM	22	34,92	3,33 (1,19)	2,00-5,69
	EB	9	14,28	3,14 (1,49)	1,00-4,69
	EC	0	0	-	-
	CT	7	11,11	3,35 (1,25)	1,64-4,69
	STA	2	3,17	1,16 (0,23)	1,00-1,32
Fruta (n = 49)	AM	26	53,06	2,66 (0,88)	2,00-5,69
	EB	17	34,69	2,15 (0,98)	1,00-4,69
	EC	0	0	-	-
	CT	7	14,28	1,80 (0,65)	1,00-2,68
	STA	3	6,12	1,11 (0,18)	1,00-1,32
Purés (n = 64)	AM	22	34,37	2,80 (0,72)	2,00-4,26
	EB	2	3,12	2,79 (1,34)	1,85-3,74
	EC	0	0	-	-
	CT	2	3,12	2,78 (1,17)	1,95-3,61
	STA	3	4,68	1,21 (0,18)	1,00-1,32

DE: desviación estándar.

AM: aerobios mesófilos. EB: enterobacteriáceas. EC: *E. coli*. CT: coliformes totales. STA: *S. aureus*.

Lozano Benito D., et. al.

**Tabla 5.** Recuentos (Log UFC/g) de microorganismos indicadores de la higiene de los procesos según el tratamiento térmico.

	Microorganismo	Muestras positivas (n)	Prevalencia (%)	Media (DE)	Mínimo-Máximo
A (n = 178)	AM	50	28,08	2,75 (0,74)	2,00-4,72
	EB	5	2,81	2,36 (1,53)	1,00-4,23
	EC	0	0	-	-
	CT	3	1,68	3,11 (1,01)	1,95-3,78
	STA	6	3,37	1,27 (0,13)	1,00-1,32
B (n = 63)	AM	37	58,73	3,04 (1,15)	2,00-5,69
	EB	27	42,86	2,38 (1,18)	1,00-4,69
	EC	0	0	-	-
	CT	15	23,81	2,29 (1,27)	1,00-4,69
	STA	4	6,34	1,08 (0,16)	1,00-1,32

DE: desviación estándar.

AM: aerobios mesófilos. EB: enterobacteriáceas. EC: *E. coli*. CT: coliformes totales. STA: *S. aureus*. A: comidas preparadas con tratamiento térmico. B: comidas preparadas sin tratamiento térmico o con tratamiento térmico que lleva algún ingrediente no sometido a tratamiento térmico.**Tabla 6.** Recuentos (Log UFC/g) de microorganismos indicadores de la higiene de los procesos según el modelo de gestión.

	Microorganismo	Muestras positivas (n)	Prevalencia (%)	Media (DE)	Mínimo-Máximo
Gestión directa (n = 152)	AM	59	38,81	2,85 (0,78)	2,00-4,72
	EB	24	15,79	2,21 (1,01)	1,00-4,69
	EC	0	0	-	-
	CT	13	8,55	1,97 (0,94)	1,00-3,78
	STA	6	3,94	1,16 (0,17)	1,00-1,32
Gestión contratada (n = 89)	AM	28	31,46	2,84 (1,12)	2,00-5,69
	EB	8	8,79	2,90 (1,64)	1,00-4,69
	EC	0	0	-	-
	CT	5	5,62	3,61 (1,22)	2,20-4,69
	STA	4	4,49	1,24 (0,16)	1,00-1,32

DE: desviación estándar.

AM: aerobios mesófilos. EB: enterobacteriáceas. EC: *E. coli*. CT: coliformes totales. STA: *S. aureus*. GD: gestión directa. GC: gestión contratada.

observan porcentajes ligeramente superiores de AM, EB y CT en las cocinas de gestión directa (38,81 %, 15,79 % y 8,55 %, respectivamente), con respecto a las de gestión contratada (31,46 %, 8,79 % y 5,62, respectivamente). Sin embargo, para STA se obtiene una prevalencia mayor en las cocinas con catering (4,49 %), que en las cocinas de gestión directa (3,94 %).

## DISCUSIÓN

La ausencia de *L. monocytogenes* y de *Salmonella* spp. indica el cumplimiento de los criterios microbiológicos de seguridad alimentaria exigidos por la normativa europea<sup>6</sup>, revelando un adecuado nivel de seguridad microbiológica en las muestras analizadas. En otros estudios realizados sobre la calidad microbiológica de las comidas servidas en comedores escolares tampoco se detectaron estos patógenos<sup>9,10</sup>. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en guarderías y colegios de Italia, se aisló *Salmonella* spp. en un 5 % de las muestras de verduras frescas y *L. monocytogenes* en una ensalada de tomate. Los autores señalaron como posible causa la ineficacia del procedimiento de limpieza y desinfección de verduras<sup>11</sup>.

El método analítico empleado para la investigación de *Cronobacter* spp. se considera idóneo y nos permitió aislar y confirmar su presencia en una única muestra, concretamente en una guarnición de lechuga y maíz.

La persistencia de *Cronobacter* spp. en ambientes de producción alimentaria<sup>12</sup> y la notificación de infecciones en ancianos y

adultos inmunocomprometidos<sup>13</sup>, ha reactivado la investigación de esta bacteria por todo el mundo en otros productos diferentes a las fórmulas infantiles, centrándose en alimentos listos para el consumo y de venta al público<sup>14,15,16,17,18</sup>.

En el estudio llevado a cabo por Vojkowska et al. (2016)<sup>17</sup> en la República Checa, se obtuvieron 38 muestras positivas en muestras de verduras y vegetales (9,6 %). En nuestro trabajo, de las 63 muestras de los segundos platos, solo 11 aportaron la guarnición de ensalada, lo que supondría un 9,10 % de prevalencia de *Cronobacter* spp. en las ensaladas. Además, 3 de las 11 ensaladas incluían maíz entre sus ingredientes. Brandao et al. (2017)<sup>18</sup> aislaron *Cronobacter* spp. en el 66,7 % de las harinas analizadas. Entre las harinas estudiadas había 11 harinas de maíz de las cuales 9 resultaron contaminadas, demostrando que esta planta puede ser reservorio de *Cronobacter* spp.

Respecto a los microorganismos indicadores de calidad higiénica, la legislación vigente no establece unos límites de aceptabilidad para las comidas preparadas. Por ello, se ha decidido comparar los resultados con los límites de aceptabilidad microbiológica fijados por un estudio colaborativo en Italia<sup>19</sup>.

Solo cuatro de las muestras positivas a AM, no resultaron aceptables. Por un lado, dos segundos platos, merluza con ensalada, que rebasó el límite superior de cuantificación del sistema TEMPO® (5,69 log UFC/g) y tortilla con ensalada, con un recuento de 5,57 log UFC/g. En ambos casos la guarnición de ensalada se componía de lechuga y maíz. Por otro lado, un puré de ternera (4,26 log UFC/g) y un primer plato de arroz con tomate

## Control microbiológico de las comidas servidas en centros de educación infantil del Ministerio de...

(4,08). Según Aycicek et al. (2004)<sup>20</sup>, recuentos por encima de 5 log UFC/g podrían significar un riesgo potencial por la posible presencia de microorganismos patógenos.

A las frutas frescas no se les aplica los criterios microbiológicos para AM porque a menudo contienen niveles altos de estos microorganismos como parte de su flora normal. Por ello, es normal que la mayor distribución de AM se encontrara en las frutas (53,06 %), con una media de 2,66 log UFC/g y una pieza de ellas superando el umbral superior de cuantificación (5,69 log UFC/g).

Con relación a las EB, ninguna de las muestras analizadas de los primeros platos superó el criterio microbiológico establecido por Tonucci et al. (2005)<sup>19</sup>. Si lo hicieron 6 de las 9 muestras positivas de los segundos platos, debido principalmente a que 5 de ellas presentaban como guarnición ensalada. Solo dos platos con tratamiento térmico, un segundo plato y un puré de ternera, mostraron resultados no aceptables. Las frutas vuelven a ser el grupo con mayor número de muestras positivas (34,69 %), con una media de 2,15 log UFC/g y una muestra superando el límite superior de cuantificación del sistema TEMPO® (4,69 log UFC/g).

Respecto a los CT, de las 6 muestras que superaron el límite para EB, de nuevo 3 de ellas con ensalada de guarnición superaron el valor de aceptabilidad para CT, incluso dos con resultados sobrepasando el umbral superior de cuantificación del equipo TEMPO® (4,69 log UFC/g). Más llamativo es que los dos platos con tratamiento térmico que superaron el límite para EB (un pastel de merluza y el puré de ternera), presentaron también recuentos no aceptables de CT (3,78 y 3,61 log UFC/g, respectivamente). Este hallazgo ocurrió en el mismo CEI, lo que denota unas malas prácticas de manipulación como pueden ser una preparación con demasiada antelación y mantenimiento posterior a una temperatura incorrecta. También puede indicar una contaminación cruzada con útiles de elaboración o recipientes de conservación mal higienizados. La prevalencia de este grupo de microorganismos en las frutas no fue tan alta (14,28 %) y con recuentos siempre por debajo de 3 log UFC/g.

Es de destacar que ninguna muestra fue positiva a EC. En este caso el Reglamento (CE) N° 2073/2005 sí establece criterios de higiene de los procesos para frutas y hortalizas troceadas listas para el consumo (3 log UFC/g)<sup>6</sup>.

En nuestro estudio, STA fue el parámetro menos detectado, con solo 10 muestras positivas (4,14 %) y presentó unos recuentos bajos, entre 1 y 1,32 log UFC/g. De las 10 muestras 6 correspondieron a platos con tratamiento térmico (tres primeros platos y tres purés), otras tres a frutas troceadas y la última a un segundo plato con ensalada. Si prestamos atención a la guía de la Agencia de Protección de la Salud del Reino Unido<sup>21</sup>, clasifica el riesgo asociado a la concentración de STA en tres niveles: bajo < 20 UFC/g, moderado 20-10<sup>4</sup> UFC/g y alto >10<sup>4</sup> UFC/g. Por tanto, en nuestro estudio, los recuentos obtenidos no suponen un riesgo alimentario.

Como muestran los resultados discutidos anteriormente, el grupo de alimentos con mayor número de muestras positivas fue el de las frutas y el que más resultados no aceptables obtuvo, respecto a los límites microbiológicos establecidos por Tonucci et al. (2005)<sup>19</sup>, fue el de los segundos platos con

guarnición de ensalada. Del 6,64 % de las muestras que superaron los límites de referencia de aceptabilidad, el 55,55 % correspondieron a la guarnición de ensaladas de los segundos platos.

En el estudio realizado por Rodríguez-Caturla et al. (2012)<sup>22</sup> en ensaladas consumidas en comedores escolares de España, se obtuvieron recuentos de AM por debajo de 6 log UFC/g, de CT por debajo de 4 log UFC/g, de STA por debajo de 2 log UFC/g y un 5 % de muestras positivas para EC. No se detectaron ni *Salmonella* spp. ni *Listeria* spp.

Abadías et al. (2008)<sup>23</sup> indicaron que la alta carga de AM puede provenir de fuentes ambientales durante las diferentes fases de manipulación, cortado y almacenamiento incorrectos.

Los CT pueden proceder de malas prácticas durante la recolección, el almacenamiento y la distribución<sup>24</sup>. Según Nguz et al. (2005)<sup>25</sup>, las hortalizas frescas tratadas con cloro todavía albergaban niveles altos de CT (5,9 log UFC/g).

La presencia de EC en los alimentos indica unas prácticas y condiciones higiénicas deficitarias<sup>26</sup>. Doyle y Erickson (2006)<sup>27</sup> concluyeron que EC es un mejor indicador de contaminación fecal que los CT, puesto que dentro de este grupo puede haber especies de origen no fecal.

La aparición de *Staphylococcus aureus* se puede deber a que los manipuladores sean portadores y por malas prácticas de higiene que contaminen los vegetales y las superficies de contacto a través de sus manos o secreciones<sup>28</sup>.

Respecto a la presencia de patógenos en productos vegetales, como ya se ha indicado anteriormente, solo se detectó *Cronobacter* spp. en una ensalada de lechuga y maíz. Tanto el estudio de Brandao et al. (2017)<sup>18</sup>, como el previo de Schmid et al. (2009)<sup>29</sup> en el que observaron la colonización de *Cronobacter* spp. en las raíces de maíz y tomate, evidenciaron que las plantas pueden ser hospedador natural de *Cronobacter* spp. Por ello, estos productos que no son sometidos a tratamiento térmico pueden representar un peligro para los niños y otras poblaciones vulnerables.

Hay numerosos estudios sobre la calidad microbiológica en frutas frescas mínimamente procesadas. Graça et al. (2017)<sup>30</sup> describieron resultados en diferentes frutas de supermercados de Portugal, con rangos de AM entre 3 log UFC/g y 9,2 log UFC/g. Abadías et al. (2008)<sup>23</sup> publicaron intervalos inferiores de AM (2 log UFC/g y 7,1 log UFC/g) y de 1,7 log UFC/g y 4,8 log UFC/g para EB en frutas comercializadas en España. En el estudio portugués los valores de CT se situaron entre 1 log UFC/g y 9,1 log UFC/g.

Otro estudio de la autora Graça et al. (2015)<sup>31</sup>, valoró la calidad microbiológica en manzanas cortadas frescas. Los valores obtenidos fueron los siguientes: AM entre 3,3 log UFC/g y 8,9 log UFC/g, CT entre 1,8 log UFC/g y 7,6 log UFC/g y un 5 % de las muestras analizadas presentaron cargas de STA entre 1 log UFC/g y 3 log UFC/g.

No se detectó EC, ni *Salmonella* spp., ni *L. monocytogenes* en ninguno de los tres estudios anteriores<sup>23,30,31</sup>. Graça et al. (2015)<sup>31</sup> también investigó en manzanas el patógeno emergente *C. sakazakii* sin que fuera hallado en ninguna de las muestras.

En nuestra investigación, no se ha detectado ningún patógeno en frutas, hecho de gran relevancia puesto que hay numerosos estudios que muestran como diferentes bacterias patógenas

Lozano Benito D., et. al.

(*Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y EC productoras de toxina Shiga) pueden sobrevivir y crecer en frutas frescas<sup>32,33</sup>.

En el sistema de autocontrol implantado por la empresa adjudicataria se contempla la higienización de frutas y hortalizas de consumo en crudo: "los productos frescos se introducirán en una solución de lejía de uso alimentaria el tiempo y dosificación indicados por el fabricante y se aclararán con abundante agua corriente". Beuchat (1998)<sup>34</sup> recomendó concentraciones entre 50 y 200 ppm durante 1-2 minutos. Sería aconsejable supervisar si se realizan eficazmente estos procedimientos.

Si analizamos la presencia de los indicadores de higiene en las muestras según el tratamiento recibido, las del grupo B, ofrecieron unos porcentajes de muestras positivas mucho más altos (AM 58,73 %, EB 42,86 %, CT 42,86 y STA 6,34) que las del grupo A (AM 28,08 %, EB 2,81 %, CT 1,68 % y STA 1,68 %). Este dato se explica, como ya se ha mencionado con anterioridad, por la inclusión dentro del grupo B de las frutas y aquellos primeros o segundos platos que incorporaban como ingredientes productos vegetales frescos. Sin embargo, en los platos tratados térmicamente, especialmente en los menús de iniciación, más de la tercera parte de los purés presentaron recuentos de AM con una media de 2,80 log UFC/g. Estos valores podrían indicar un tratamiento térmico insuficiente, una conservación inadecuada, una contaminación cruzada posterior a la elaboración, etc.

Respecto al modelo de gestión, a falta de un tratamiento estadístico analítico, parece que no hay influencia de esta variable en los resultados. La prevalencia de AM, EB y CT ha sido mayor en los CEI con cocina propia, al contrario que para STA, que ha presentado mayor prevalencia en las cocinas con gestión contratada (catering).

La contaminación por STA, como ya se ha indicado, tiene origen humano. *Staphylococcus aureus* sobrevive bien en la piel por lo que se puede vehicular a través de las manos si no hay una correcta higienización de las mismas y también se transmite a los alimentos en forma de aerosoles al estornudar, toser o hablar<sup>28</sup>. Por ello, si los manipuladores de alimentos simultanean tareas de cuidado de los bebés con la manipulación de alimentos, el comportamiento infantil puede favorecer la diseminación de los microorganismos del tracto respiratorio. Esta situación podría darse en los CEI con servicio de catering, puesto que el personal de estas guarderías podría estar menos especializado al no tener que elaborar los alimentos y solo tener que regenerar, mantener y servir los platos cocinados, así como pelar y trocear las frutas.

En el estudio microbiológico de Campos Díaz et al. (2003)<sup>10</sup> en comidas preparadas de comedores escolares en Tenerife, no se encontraron diferencias significativas según el tipo de gestión. Si que observaron, que en ambos tipos de cocina las ensaladas y los complementos fueron el tipo de platos con un mayor porcentaje de muestras no aptas.

## CONCLUSIONES

Se considera que las comidas servidas en los CEI del Ministerio de Defensa tienen un alto grado de calidad microbiológica. No obstante, se recomienda revisar los procedimientos de higienización de las ensaladas y frutas así como las prácticas de manipulación durante la elaboración de los purés de los menús de iniciación.

Por último, se propone realizar más controles microbiológicos, incluida la investigación de *Cronobacter* spp., en los productos vegetales frescos servidos en otras instalaciones alimentarias militares.

## AGRADECIMIENTOS

A los compañeros inspectores veterinarios encargados de enviar las muestras para su análisis y al personal de la empresa del servicio de alimentación por su colaboración, sin la que cual no hubiera sido posible la realización de este estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Buzby JC. Children and microbial foodborne illness. *Food Review* 2001; 24 (2): 32-7.
- Caubilla-Barron J, Hurrell E, Townsend S, Cheetham P, Loc-Carrillo C, Fayette, O et al. Genotypic and Phenotypic Analysis of *Enterobacter sakazakii* Strains from an Outbreak Resulting in Fatalities in a Neonatal Intensive Care Unit in France. *Journal of clinical microbiology JCM* 2007; 45 (12): 3979-3985.
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* [en línea] 2016; 14 (12) [Consulta: 22 diciembre 2017]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2016.4634/abstract>.
- Andreu Román MM, Allué Tango M, Berbel Hernández C, Andrés García I. *Salmonella* serovar Poona outbreak in a nursery. *Pediatría Atención Primaria* 2016; 18 (69): 35-43.
- Jourda-da Silva N, Fabre L, Robinson E, Nisavanh A, Bruyand M, Mailles A et al. Ongoing nationwide outbreak of *Salmonella* Agona associated with internationally distributed infant milk products, France, December 2017. *Euro Surveill.* 2018; 23(2).
- Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* L338 de 22 de diciembre de 2005 y sus modificaciones Reglamento (CE) N° 1441/2007 de la Comisión de 05 de diciembre de 2007, DOUE L332 07/12, que modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y el Reglamento (UE) N° 365/2010 de la Comisión de 28 de marzo de 2010, DOUE L107 29/04, que modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios).
- Aguirre Bastarrica E, Aguirre Bastarrica S. Estudio y programa de mejora de la seguridad alimentaria en centros infantiles asturianos. *Revista de toxicología* 2013; 30: 165-170.
- Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición. *BOE*, 6 de julio de 2011, núm. 160: 71283-71319.
- Pérez-Silva M, Belmonte S, Martínez J. Estudio microbiológico de los alimentos elaborados en comedores colectivos de alto riesgo. *Revista Española de Salud Pública* 1998; 72 (1): pp: 67-75.
- Campos J, Rodríguez C, Sierra A, Arias Á. Estudio microbiológico de las comidas servidas en los comedores escolares de la isla de Tenerife. *Revista Española de Salud Pública* 2003; 77 (6): 749-760.
- Marzano MA, Balzaretta CM. Protecting child health by preventing school-related foodborne illnesses: Microbiological risk assessment of hygiene practices, drinking water and ready-to-eat foods in Italian kindergartens and schools. *Food control* 2013; 34 (2): 560-567.
- Mullane NR, Whyte P, Wall PG, Quinn T, Fanning S. Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterise and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 116 (1): 73-81.
- Ray P, Das A, Gautman V, Jain N, Wig JD, Sharma M. Postoperative No-

