

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE VETERINARIA

**INCIDENCIA Y COMPORTAMIENTO
DE *SALMONELLA* Y *LISTERIA*
EN PECHUGAS DE PAVO CURADAS**

Martí Trepal i Quilez
Junio de 2002

A mi mujer, Mireia, por su
paciencia y comprensión.

A mis Padres, por los sacrificios
hechos para darme una educación.

Quiero agradecer la realización de esta tesis doctoral a las siguientes personas:

A la empresa de embutidos Esteban España S. A., de Olot, y especialmente a su gerente, Sr. Xavier España, por permitirme realizar esta tesis doctoral en sus instalaciones y en su laboratorio.

A Narcís Grebol, Director de I+D de Esteban España S. A., por sus consejos y su inestimable ayuda a la hora de plantear y realizar toda la tesis.

A todo el equipo del laboratorio y de la planta piloto de Esteban España S.A., y particularmente a Mariona Padrosa, jefe del laboratorio, por su paciencia, comprensión y ayuda técnica durante estos dos años. También, a Mireia Lario, técnico de laboratorio, a Glòria Martí, jefe de la planta piloto, y a Carme Torras, técnico de la planta piloto, por su paciencia al soportar mi interferencia en su trabajo durante estos años.

A M^a Teresa Mora, catedrática de Higiene e Inspección de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UAB, por su experiencia y sus sabios consejos a la hora de plantear, ejecutar, escribir y corregir esta tesis.

A Emiliano Quinto, profesor titular de Higiene e Inspección de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UAB, por su inestimable ayuda, consejos y directrices en la realización de esta tesis.

A mis compañeros veterinarios, Albert Bramon y Josefina Juscafresa, por ser ellos quienes me apoyaron y animaron a realizar los estudios posgrado que finalizan con la elaboración de esta tesis.

Y finalmente, a toda mi familia, incluida mi familia política, por su comprensión, paciencia y preocupación durante todo este tiempo.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
	1. Antecedentes históricos.....	6
	1.1 <i>Listeria</i>	6
	1.2 <i>Salmonella</i>	7
	2. Características generales de los microorganismos.....	8
	2.1 <i>Listeria</i>	8
	2.2 <i>Salmonella</i>	10
	3. Características de cultivo y de detección de los microorganismos.....	12
	3.1 <i>Listeria</i>	12
	3.2 <i>Salmonella</i>	19
	4. Características ecológicas y epidemiológicas.....	21
	4.1 <i>Listeria</i>	21
	4.2 <i>Salmonella</i>	31
	5. Características de resistencia, control y prevención.....	38
	5.1 <i>Listeria</i>	38
	5.1.1 Temperatura.....	38
	5.1.2 pH.....	41
	5.1.3 Actividad de agua.....	41
	5.1.4 Vacío.....	42
	5.1.5 Altas presiones.....	42
	5.1.6 Competencias biológicas.....	45
	5.2 <i>Salmonella</i>	47
	5.2.1 Temperatura.....	47
	5.2.2 pH.....	48
	5.2.3 Actividad de agua.....	49
	5.2.4 Altas presiones.....	49
	6. Comportamiento de <i>Listeria</i> y <i>Salmonella</i> en la carne.....	50
	6.1 <i>Listeria</i>	50
	6.2 <i>Salmonella</i>	52

III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	56
1. Muestras.....	57
1.1 Elaboración del producto.....	57
1.2 Preparación de las muestras de las partidas nº 1, 2 y 3.....	58
1.2.1 Preparación de los inóculos.....	58
1.2.2 Adición de los inóculos.....	59
1.2.3 División de las partidas en lotes.....	59
1.2.4 Aplicación de vacío.....	60
1.2.5 Aplicación de las altas presiones.....	60
1.2.6 Protocolo de recogida de muestras...	60
1.3 Preparación de las muestras de la partida nº 4.....	61
1.3.1 Preparación e inoculación del microorganismo.....	62
1.3.2 División de la partida en lotes.....	62
1.3.3 Protocolo de recogida de muestras...	63
2. Determinaciones físico-químicas.....	64
2.1 Determinación de pH.....	64
2.2 Determinación de la actividad de agua.....	64
3. Determinaciones microbiológicas.....	64
3.1 Determinación de <i>Listeria innocua</i>	64
3.1.1 Recuento de <i>Listeria innocua</i>	64
3.1.2 Análisis de número más probable (NMP).....	65
3.1.3 Identificación de <i>Listeria innocua</i>	65
3.2 Determinación de <i>Salmonella choleraesuis</i> . 3.2.1. Recuento de <i>Salmonella choleraesuis</i>	69
3.3 Recuento de microorganismos mesófilos totales a 30°C.....	72

3.4	Recuento de microorganismos de la flora láctica.....	72
3.5	Recuento de microorganismos del género <i>Micrococcus</i>	72
3.6	Recuento de mohos y levaduras.....	73
4.	Estudio estadístico.....	73
5.	Medios de cultivo utilizados.....	73
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		82
1.	Resultados de las partidas n° 1, 2 y 3.....	83
1.1	Resultados de <i>Listeria innocua</i>	83
1.2	Resultados de <i>Salmonella choleraesuis</i>	87
1.3	Resultados del pH y de la actividad de agua.....	90
1.4	Discusión de los resultados de las partidas n° 1, 2 y 3.....	93
2.	Resultados de la partida n° 4.....	97
2.1	Resultados del lote 1.....	97
2.2	Resultados del lote 2.....	98
2.3	Resultados del lote 3.....	98
2.4	Resultados del lote 4.....	99
2.5	Resultados del pH y de la actividad de agua.....	106
2.6	Discusión de los resultados de la partida n° 4.....	109
V. CONCLUSIONES.....		112
VI. BIBLIOGRAFÍA.....		115

I. INTRODUCCIÓN

Las toxiinfecciones alimentarias provocadas por los microorganismos patógenos del género *Salmonella* y *Listeria* tienen una gran importancia en los países desarrollados por el gran número de personas infectadas y por la industrialización en la producción de alimentos que favorece la diseminación de estos patógenos.

Hemos de tener en cuenta que la listeriosis humana afecta principalmente a las personas adultas de más de sesenta años, a las mujeres embarazadas, a los niños recién nacidos y también a todas aquellas personas que tienen comprometido su sistema inmunitario. Por todo ello, en las personas susceptibles de padecer esta enfermedad la mortalidad es elevada; así, estudios recientes han demostrado que esta enfermedad tiene una incidencia de aproximadamente 5 casos por millón de personas.

Por lo que se refiere a la incidencia de las bacterias del género *Listeria* en las aves de corral y, más concretamente en los pavos, estudios recientes han demostrado que entre un 23 a un 60% de las canales de las aves de corral en Estados Unidos y en Inglaterra son positivas a la bacteria patógena *L. monocytogenes* (Carpenter y Harrison 1989; Cox y col., 1989; Genigeorgis y col., 1990; Franco y col., 1995; Rijpens y col., 1997; Uyttendaele y col., 1997).

La salmonelosis es una enfermedad de origen alimentario que afecta a un gran número de personas y sus vehículos de transmisión son tan amplios que se la considera una de las más importantes toxiinfecciones alimentarias mundiales.

La importancia de esta enfermedad radica tanto en la elevada morbilidad entre las personas como por los elevados costes que provoca en la sanidad pública, además de los generados por las pérdidas de producción animal y el aumento de los costes de producción en los corrales infectados.

En el año 1994 un estudio realizado en Estados Unidos por Bryan y Doyle (1994) reveló que los casos de salmonelosis en humanos habían pasado de 740.000 a 4 millones y se estimaba que en la actualidad se llegaría a 4,8

millones de casos, todos ellos relacionados directamente con aves de corral infectadas con las bacterias del género *Salmonella*.

La prevalencia de salmonela en los productos derivados de aves de corral es muy variable, desde un 2 a un 100%. La media de la prevalencia en los animales es de un 30% y los productos derivados del pavo son responsables de un 14 a un 56% de los brotes epidémicos de salmonelosis en humanos (Bryan, 1988).

En los países anglosajones de la Unión Europea el consumo de pechugas de pavo curadas en lonchas tiene unos índices elevados, generando grandes sumas de dinero e implicando una importante industria de los productos derivados de pavo.

En la legislación de la Unión Europea, que regula el mercado interior comunitario, no hay ninguna especificación del límite microbiológico sobre los productos curados derivados de las carnes de las aves de corral, provocando que los países consumidores de estos productos apliquen la legislación y las exigencias sanitarias y comerciales de la comercialización de las carnes frescas de aves de corral, con diferentes interpretaciones que repercuten en las exigencias para la comercialización de estos productos curados. Algunas pueden parecer excesivas con respecto a lo que el producto necesita, y exigen refrigeración del producto en todo su proceso comercial, es decir, desde el transporte hasta la exposición del producto al público en los centros comerciales, e incluso que en el etiquetado de estos productos figure la obligación de ser conservados en refrigeración hasta el momento de ser consumidos.

Este trabajo se planteó para estudiar el efecto que tiene todo el proceso de elaboración industrial de pechugas de pavo curadas sobre los microorganismos patógenos responsables de las toxiinfecciones alimentarias más graves que están asociadas a este tipo de producto. También para conocer cual es la mejor combinación de temperatura y proceso de conservación (vacío o altas presiones) que garantice la conservación del producto en las mejores condiciones de calidad higiénica y organoléptica.

Para ello nos marcamos los siguientes objetivos:

1. Estudio de la incidencia de microorganismos del género *Salmonella* y del género *Listeria* en las pechugas de pavo frescas.
2. Estudio del comportamiento y supervivencia de *Salmonella* y *Listeria* durante el proceso de elaboración de pechugas de pavo curadas.
3. Estudio del comportamiento y supervivencia de *Salmonella* y *Listeria* durante toda la vida comercial del producto.
4. Estudio del efecto de las distintas temperaturas y del tratamiento con altas presiones sobre el comportamiento y supervivencia de *Salmonella* y *Listeria*.
5. Estudio de la influencia de la flora acompañante sobre el comportamiento y supervivencia de *Salmonella* y *Listeria*.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. ANTECEDENTES HISTORICOS

1.1 *Listeria*

El género *Listeria* spp recibe su nombre en honor del cirujano británico Lord Joseph Lister (ICMSF, 1996) y la especie *L. monocytogenes* por el síndrome de monocitosis presente en determinados enfermos de listeriosis.

En 1891, el investigador francés Hayen, describió por primera vez unos organismos pequeños Gram positivos con forma de vara aislados de tejidos humanos. Dos años más tarde, en Alemania, Henle aisló unos organismos muy similares a los descritos por Hayen (Gray y Killinger, 1966). En 1911, Hülphers describió de nuevo la existencia de estos mismos organismos aislándolos de focos necróticos de hígado de conejo y los denominó *Bacillus hepatis*.

La caracterización completa de estos organismos fue realizada por Murray y col. (1926). El microorganismo fue aislado a partir de conejos y cobayas de laboratorio infectados que desarrollaron lesiones hepáticas y monocitosis pronunciadas. A partir de este momento el microorganismo fue denominado *Bacterium monocytogenes*. Poco tiempo más tarde, Pirie (1940) logró aislar este microorganismo Gram positivo al que llamó *Listerella hepatolítica*.

La primera descripción de listeriosis en los humanos fue realizada por Nyfeldt en 1929 (Gray y col., 1966), el cual aisló esta bacteria a partir de sangre de pacientes que sufrían una enfermedad parecida a la mononucleosis infecciosa. En 1936, Burn, aisló el microorganismo de cadáveres de neonatos e implicó a la bacteria como causa de meningitis en adultos (Burn, 1936). En 1936 se reconoció por primera vez a *L. monocytogenes* como causa de infección humana durante el periodo perinatal y como responsable de meningitis en adultos.

En 1940, y por razones taxonómicas, se adoptó la propuesta del nombre que actualmente conocemos: *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940).

El mayor brote epidémico de listeriosis en humanos descrito en Alemania entre los años 1949 y 1951 se relacionó directamente con el consumo de leche cruda (Seelinger, 1961; Gray y Killinger 1966). Hasta 1960 sólo se habían comunicado 500 casos de listeriosis en todo el mundo, alcanzando en 1981 la cifra de 10.100 (Ralovich, 1984). Al menos desde 1980 los cinco mayores brotes epidémicos de listeriosis humana asociados a los alimentos se han concentrado principalmente en las áreas geográficas de Europa y América del Norte, de los cuales los más destacados fueron en 1981, en Canadá; en 1983 en Massachusetts (E.E.U.U.); en 1985 en Los Angeles y California (E.E.U.U.) ; entre 1985 y 1987 en Suiza; y en 1992 en Francia.

1.2 *Salmonella*

En el año 1874, Budd fue el primero en relacionar que las fiebres tifoideas habían sido transmitidas por el agua y los alimentos. *Salmonella typhi*, agente etiológico de la enfermedad, fue descubierta en el año 1880 por Eberth y el microorganismo fue aislado en 1884 por Gaffky. *Salmonella choleraesuis* fue aislada de un cerdo en el que se diagnosticó la cólera del cerdo (ICMSF, 1996).

El nombre del género fue acuñado por Lignières en el año 1900 en honor a los trabajos realizados por el doctor D. E. Salmon, bacteriólogo americano que caracterizó los bacilos causantes del cólera del cerdo.

La primera vez que un laboratorio confirmó un brote de toxiinfección alimentaria provocado por salmonelosis, se vieron implicados 57 personas que comieron carne de un animal enfermo. *Salmonella enteritidis* fue aislada de los órganos de una de las personas fallecidas y de la carne y la sangre del animal (ICMSF, 1996). Desde entonces la salmonela ha sido reconocida como la mayor causante de fiebres entéricas y gastroenteritis.

2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS MICROORGANISMOS

2.1 *Listeria*

Según lo descrito en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9ª edición (1994), las listerias son bacilos de forma regular y con forma de vara corta de aproximadamente 0,4-0,5 µm de diámetro y 0,5-2 µm de longitud con las puntas redondeadas. Algunas veces pueden tener forma cocoide, apareciendo como células individuales o bien en cadenas cortas.

Pueden ser móviles cuando se cultivan a temperaturas de 20 a 25°C y ésta movilidad está provocada por la presencia de tres o cuatro flagelos de implantación periférica. Estos flagelos pueden tener longitudes de 6 a 20 µm o más.

La morfología de las colonias que han crecido en medios nutritivos sólidos (agar) a las 24-48 horas son de un tamaño de 0,5-1,5 mm de diámetro, redondas, translúcidas con apariencia de gota de rocío, ligeramente convexas con la superficie fina y el margen entero. Las colonias tienen un color gris azulado con la luz normal y un color azul verde brillante con la luz oblicua (ICMSF, 1996). Cuando los cultivos en medios sólidos de agar son viejos, de 3 a 7 días, las colonias son más grandes, de 3 a 5 mm de diámetro, con una zona central más opaca y con un aspecto más áspero y rugoso.

Las bacterias del género *Listeria* son microorganismos Gram positivos que tienen un metabolismo aeróbico y anaerobio facultativo. Son oxidasa negativas, rojo de metilo positivo, Voges-Proskauer positivo, no utilizan el citrato exógeno, no producen indol y no hidrolizan ni la urea ni la gelatina ni la caseína. No producen H₂S y no reducen los nitratos a nitritos. Todas sus cepas producen fosfatasa alcalina.

Se admiten cinco especies claramente diferenciables: *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii*; mientras que *L. denitrificans*, *L. grayi* y *L. murrayi* se clasifican como

especies *incertae sedis*, de clasificación incierta. Trabajos recientes han determinado que *L. denitrificans* no pertenece al género, y ha sido clasificada de nuevo como *Jonesia denitrificans*. Sin embargo, *L. grayi* y *L. murrayi* permanecen dentro del género, aunque se ha considerado que no son lo suficientemente diferentes como para garantizar el que sean especies separadas, por lo tanto, han sido clasificadas de nuevo como una única especie para la que se ha propuesto el nombre de *L. grayi*. Finalmente, *L. ivanovii* consta de dos subespecies: *L. ivanovii* subespecie *ivanovii* y *L. ivanovii* subespecie *londoniensis* (Bell y Kyriakides, 1998).

Por lo tanto, según la información más reciente, el género *Listeria* está constituido por las especies que aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Especies del género *Listeria* spp (Bell y Kyriakides, 1998)

Especies de <i>Listeria</i> spp	Nombre anterior de la especie
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacterium monocytogenes</i>
<i>Listeria innocua</i>	
<i>Listeria welshimeri</i>	
<i>Listeria seeligeri</i>	
<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria grayi</i> , <i>Listeria murrayi</i>
<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
subespecie <i>ivanovii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> serovariedad 5
subespecie <i>londoniensis</i>	

Las diferentes especies de *Listeria* se pueden diferenciar entre ellas por su capacidad de fermentar los carbohidratos y por su capacidad β -hemolítica, tal y como se especifica en la Tabla 2.

Tabla 2. Diferencias entre las especies del género *Listeria* spp (adaptación de ICMSF, 1996)

ESPECIES LISTERIA	FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS			CAMP TEST		HEMOLISIS
	M	R	X	SA	RE	
<i>L. monocytogenes</i>	-	+	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	v	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	v	+	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	-	-	+	+	-	+
<i>L. ivanovii</i>	-	-	+	-	+	+
<i>L. grayi</i>	+	v	-	-	-	-

[M, manitol; R, L-rhamnosa; X, D-xilosa. "+" fermenta el azúcar en cuestión y produce gas, "v" puede o no fermentar el azúcar en cuestión y "-" no fermenta el azúcar en cuestión ni produce gas. CAMP-test (CHRISTIE, ATKINS, MUNCH-PETERSEN fenómeno): *L. monocytogenes* muestra una zona hemolítica típica en placas de sangre cuando se cultivan junto a *Staphylococcus aureus* β -hemolítico (SA) y/o *Rhodococcus equi* (RE)].

2.2 *Salmonella*

Salmonella es un género de la familia de las *Enterobacteriaceae* (Brenner, 1984). Los miembros de esta familia se caracterizan por ser Gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, bacterias con forma de barra y con las puntas redondeadas. Las formas móviles tienen flagelos de implantación periférica. *Salmonella* es normalmente móvil, pero *S. pullorum*, *S. gallinarum* y un serotipo de *S. arizonae* no son móviles. La mayoría de las cepas, a excepción de *S. typhi*, son aerógenas.

Producen ácido y a veces gas a partir de la glucosa, raramente fermentan la lactosa o la sacarosa. Son normalmente catalasa positivas y oxidasa negativas y reducen los nitratos a nitritos. La reacción del rojo de metilo es positiva, el test Voges-Proskauer es negativo y la reacción del Indol es negativa. Lisina descarboxilasa positiva, la fermentación del dulcitol es positiva, el crecimiento en caldo KCN es negativo, la utilización de malonato de sodio es negativa. No desaminan la fenilalanina, no hidrolizan la urea, no licúan rápidamente la gelatina en nutrientes y no producen DNAsa ni lipasa. El citrato es utilizado normalmente como única fuente de carbono (ICMSF, 1996; NF ISO 6579, 1993).

La mayoría de los miembros de esta familia se encuentran en el tracto intestinal de los humanos y de los animales ya sea como patógenos o como comensales.

Según lo descrito en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9ª edición (1994) el género *Salmonella* se subdivide en cinco subgéneros distintos. Su caracterización se basa en la hibridación DNA/DNA. Así pues, una homología del DNA >70% quiere decir que las bacterias pertenecen a la misma especie, mientras que la caracterización de los diferentes subgéneros de *Salmonella* se basa no solo con la hibridación DNA/DNA, sino también en las características bioquímicas y en las formas de aislamiento que son utilizadas habitualmente.

Al subgénero I pertenecen las salmonelas típicas patógenas aisladas del contenido intestinal de los animales de sangre caliente y que son la mayoría. Al subgénero II y III pertenecen aquellas que se han aislado de animales de sangre fría, tales como *S. salamae* y *S. arizonae*. Al subgénero IV y V pertenecen todas aquellas que se encuentran mayoritariamente en el medio ambiente y que raramente se han identificado como patógenas para el hombre.

Después de la clasificación en subgéneros, la clasificación más importante del género *Salmonella* se basa en las características serológicas de la bacteria de acuerdo al esquema de Kauffman-White, el cual fue concebido por White y desarrollado por Kauffman (ICMSF, 1996). La serología se basa en los antígenos somáticos O, el antígeno flagelar H y el antígeno capsular Vi. De esta forma se pueden identificar hasta 2.200 serovares diferentes de *Salmonella* describiéndolos por una serie de números y letras que representan a 64 antígenos O, H y Vi diferentes.

Finalmente, cada serovar se puede subdividir según sus características bioquímicas (biovares o biotipos), su resistencia a los bacteriófagos (fagovares o lisotipos), su resistencia a los antibióticos o a los metales pesados, y por su sensibilidad a las bacteriocinas o por la producción de bacteriocinas. Todas estas características son dependientes del DNA

extracromosómico que normalmente se mantiene estable durante todo el periodo que dura un brote infeccioso.

3. CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO Y DE DETECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

3.1 *Listeria*

Prácticamente todas las cepas de *Listeria* son catalasa positivo cuando crecen en medios de cultivo y bajo condiciones de laboratorio normales y habituales, pero pueden dar reacciones negativas si se cultivan en medios que contengan concentraciones bajas de carne o de extracto de levadura. La actividad catalasa de las listerias está deprimida cuando los medios de cultivo contienen altas concentraciones de glucosa, es decir, valores del 10% w/v (ICMSF, 1996).

Fermentan la glucosa transformándola mayoritariamente en L(+)-ácido láctico y también fermentan otros azúcares (como la amigdalina, celubiosa, esculina, fructosa, mannososa y salicina) en 48 horas dando ácidos pero no gas. Todas las cepas producen β -D-galactosidasa. Las bacterias del género *Listeria* no hidrolizan ni la celulosa, ni la tirosina ni la xantina.

Por lo tanto, los carbohidratos son esenciales para el crecimiento de *Listeria*, siendo la glucosa el carbohidrato de elección. La adición de glucosa en un medio de cultivo de enriquecimiento es esencial para obtener crecimientos óptimos del microorganismo. Así ocurre con la adición de esculina en el medio como única fuente de carbohidratos (Swaminathan y col., 1988).

Las cepas de *Listeria* tienen ciertos requisitos nutricionales para su crecimiento. Suplementos de CINA en un mínimo de un 3% y un máximo de un 10% (Iriarte y col., 1993) y de ácidos biliares en un 40% (ICMSF, 1996) en los caldos de cultivo favorecen el crecimiento de *Listeria*. También crecen en presencia de 0,025% de acetato de talio; 3,75% de tiocianato potásico y

0,01% de 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolium (ICMSF, 1996). El tiocianato potásico ha sido incorporado en medios de cultivo de enriquecimiento como agente selectivo para la recuperación de bacterias de la especie *L. monocytogenes* (Golden y col., 1987).

La utilización de un 0,04% de telurito potásico en los medios de cultivo inhibe el crecimiento de un amplio espectro de especies de microorganismos Gram negativos (ICMSF, 1996; Buchanan y col., 1987). La adición de 40 µg/ml de ácido nalidíxico en el medio de cultivo selectivo de enriquecimiento para la *Listeria* ha resultado ser muy útil para inhibir el crecimiento de los microorganismos contaminantes Gram negativos (Donnelly, 1987; Buchanan y col., 1987; Swaminathan y col., 1988) y como agente selectivo para la recuperación de *L. monocytogenes* (Golden y col., 1987). Así mismo, la adición de 50 µg/ml de acriflavina en el mismo medio de cultivo inhibe el crecimiento de los microorganismos contaminantes Gram positivos (Donnelly, 1987) e inhibe específicamente el crecimiento de los cocos Gram negativos y positivos (Swaminathan y col., 1988).

Se ha observado que la utilización de feniletanol, glicina y cloruro de litio en los medios de cultivo para las bacterias del género *Listeria* es un eficaz sistema de inhibición del crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram positivas y negativas, sin afectar de forma apreciable la recuperación de *L. monocytogenes* (Golden y col., 1987).

La utilización simultánea de moxalactamo, bacteriocinas y ácido nalidíxico es una combinación efectiva de agentes selectivos que dan apoyo al crecimiento de la *Listeria*, mientras provocan la supresión del crecimiento de otras especies, incluso de *Staphylococcus aureus* (Buchanan y col., 1987)

Todas las cepas de *Listeria* son sensibles a numerosos antibióticos. Así mismo, gran número de cepas de *Listeria* producen bacteriocinas (ICMSF, 1996) que no inhiben a las bacterias Gram negativas, pero que sí son activas contra la mayoría de los bacilos y de los estafilococos.

Algunas de las especies del género *Listeria* son β -hemolíticas en agar sangre. Esta actividad hemolítica se demuestra con la aparición de zonas de hemólisis en sangre, de mayor o menor tamaño en función de la especie de *Listeria* que se trate, alrededor de la colonia una vez cultivada en el agar sangre. Una actividad β -hemolítica débil o bien dudosa puede solucionarse con la utilización del CAMP test que potencia la actividad hemolítica de la *Listeria* (ICMSF, 1996).

L. innocua y *L. monocytogenes* comparten el mismo hábitat ecológico, los mismos requerimientos fisiológicos y pueden crecer perfectamente en medios selectivos corrientes de *Listeria*, produciendo colonias que morfológicamente son indistinguibles. Bajo estas circunstancias, *L. monocytogenes* puede ser encubierta y, por lo tanto, no se detecta. Un estudio realizado por Blanco y col. (1989) basado en la adición de células rojas en el medio de cultivo selectivo ("Técnica de la sobrecapa") ha permitido detectar la actividad hemolítica de las colonias patógenas de *Listeria "in situ"* en el agar selectivo de aislamiento, sin más subcultivos posteriores. Las colonias de *Listeria* visualizadas mediante este método tienen la morfología típica con un halo negro alrededor debido a la hidrólisis de la esculina, y con un pico negro en el centro debido a la reducción del telurito.

Mioni y col. (1998) desarrollaron un medio de cultivo que diferencia entre *L. innocua* y *L. monocytogenes*. Se basa en la puesta en evidencia de la fosfolipasa C, específica para el fosfatidilinositol, característico solamente de la especie patógena, lo que se traduce en el medio de cultivo selectivo ALOA en una colonia de color azul-verde con un halo opaco alrededor, que permite determinar la colonia como presuntamente *L. monocytogenes*, incluso cuando hay una flora mixta de fondo.

Los componentes selectivos del medio ALOA son el cloruro de litio, particularmente eficaz frente a las bacterias del género *Bacillus*, y una combinación de sustancias antimicrobianas que limitan el crecimiento de las poblaciones de microorganismos contaminantes. El primer compuesto diferencial es el cromógeno 5-bromo, 4 cloro, 3 indolil, β -D-glucurónido (X-

GLUC o BCIG) que actúa como sustrato para el enzima β -glucosidasa, el cual está presente en todas las especies del género *Listeria*. La ruptura de la unión β determina la liberación del cromógeno dando lugar a una coloración azul-verde.

La puesta en evidencia de la patogenicidad de la especie en cultivos en placa se debe al factor de virulencia, fosfolipasa C, que permite a la *L. monocytogenes* crecer en el interior de las células huésped (también presente en *L. ivanovii*) manifestándose en el medio de cultivo sólido con la producción de un halo opaco en torno a la colonia (Mioni y col, 1998; Garcia-Aguado y Úbeda, 1998; Vlaemyneck y col., 2000; Artault y col., 2000). El aislamiento de *L. ivanovii* es muy raro en los alimentos y es considerado patógeno para los animales y sólo excepcionalmente para el hombre.

Artault y col. (2000) en la validación del método ALOA por parte de AFNOR, demostraron que este método tiene una especificidad de confirmación de la especie *L. monocytogenes* de un 100% de las colonias características con halo y de *Listeria* spp. en las colonias que no tenían halo. De todas las colonias con halo examinadas, en ningún caso fue identificada *L. ivanovii*, única especie que podría crear problemas de falsos positivos al considerar únicamente la valoración morfológica de la colonia.

El límite de detección del método ALOA, según este estudio, es de 10 a 100 ufc/ml con el caldo de enriquecimiento Fraser. El límite de sensibilidad del método permite la detección de niveles bajos de contaminación (<10 ufc/25 g). La especificidad de ALOA se demuestra con que todas las cepas de *L. monocytogenes* desarrollaron sus características propias después de 24 horas de incubación. Finalmente, Artault y col. (2000), demostraron la precisión del método a través del estudio de todas las muestras positivas detectadas con el método de referencia, y que fueron también identificadas con el método ALOA.

Vlaemyneck y col. (2000) detectaron con el medio ALOA un 4,3% más de positivos que con el método ISO a partir de productos lácteos y de

muestras de carne. Con el método ALOA encontraron un 13,9% de falsos negativos mientras que con los métodos tradicionales de PALCAM/OXFORD se encontraron un 38,9%. Indicaron que ALOA es claramente superior a OXFORD y PALCAM cuando las muestras contienen *L. monocytogenes* y *L. innocua*.

La desventaja del método de referencia para la detección de *L. monocytogenes* (NF EN ISO 11290-1), desde el punto de vista de la industria agroalimentaria, es que se necesitan más de 7 días para su identificación y, además, este método con frecuencia no es lo suficientemente sensible para los alimentos contaminados con *L. monocytogenes* y *Listeria* spp. (Artault y col., 2000).

En la práctica del laboratorio la búsqueda de *L. monocytogenes* cuenta con una diversidad de caldos de enriquecimiento y de medios de aislamiento (Farber y Peterkin, 1991; Aguado y col., 1997), que hace compleja la elección del método más idóneo a emplear. Así, podemos encontrarnos con el método L-Palcam (NGFIS; Netherlands Government Food Inspection Service), el método Fraser (AFNOR; Association Française de Normalisation) o bien con el método LEB (FDA; Foods and Drugs Administration).

Aguado y col. (1997), recuperaron con el método L-Palcam un mayor número de *L. monocytogenes* en los vegetales congelados y en los productos cárnicos cocidos. Sin embargo, en el salmón ahumado el método más eficaz fue el Fraser. Respecto a la *Listeria* spp., por el método Fraser obtuvieron el mayor número de aislamientos (84,2%), seguido del método L-Palcam (55,3%) y, en último lugar, el método LEB (36,8%). En el caso del salmón ahumado, recuperaron el 100% de las cepas de *Listeria* spp. por el método Fraser.

Estos autores apuntaron una mayor eficacia de los caldos L-Palcam y Fraser para la recuperación de *L. monocytogenes* en los alimentos, aunque su grado de recuperación varía en función del tipo de alimento. Para la recuperación de especies del género *Listeria* en general, el caldo más eficaz resultó ser el método Fraser con independencia del alimento analizado.

Así, el caldo Fraser se ha mostrado altamente selectivo recuperando el mayor porcentaje de *Listeria* spp. aunque ésta estuviera enmascarada por las *L. monocytogenes* presentes (Curiale y Lewus, 1994).

Iriarte y Villanueva (1993) describieron un método rápido para la detección de microorganismos del género *Listeria* spp. contaminantes de embutidos cárnicos crudos curados, consistente en un enriquecimiento de la muestra en caldo L-Palcam y una posterior identificación de la bacteria con una galería API (BioMérieux). Con este método rápido de identificación de *Listeria* consiguieron reducir el tiempo de 4 días, necesario como mínimo de las técnicas existentes, a 48 horas.

Golden y col. (1987) utilizaron con buenos resultados el procedimiento de siembra directa en placa sin el enriquecimiento previo para recuperar *L. monocytogenes* de alimentos como la leche y las mezclas de helado, los cuales contienen niveles bajos de población microbiana de fondo. Para la recuperación de *L. monocytogenes* a partir de alimentos como la calabaza cruda y el queso tipo Brie, que contienen elevadas poblaciones de otros microorganismos, no es tan satisfactorio el uso de este procedimiento de siembra directa en placa.

El procedimiento de siembra directa en placa puede ser utilizado para la recuperación y recuento de poblaciones de *L. monocytogenes* con unos niveles de población de hasta 10^2 ufc/ml ó g cuando las poblaciones de microflora de fondo son escasas, aunque no es eficaz cuando son altas.

La incubación de las muestras a 4°C inhibe el crecimiento de la mayoría de los microorganismos mientras que permite la proliferación lenta de *L. monocytogenes*. Por lo tanto, el enriquecimiento en frío es esencial para el proceso selectivo de las cepas de *Listeria*. Pero si son incorporados ciertos agentes selectivos en el medio de enriquecimiento, el almacenamiento en frío ya no es necesario para el cultivo del microorganismo, acortándose de este modo el periodo de enriquecimiento. Por esta razón, el ácido nalidíxico y el tiocianato potásico han sido incorporados en los medios de

enriquecimiento como agentes selectivos para *L. monocytogenes* (Golden y col., 1987).

Según Yu y Fung (1991) una incubación en caldos de cultivo de enriquecimiento a temperaturas de 30°C durante 24 horas es suficiente para conseguir una adecuada densidad de *L. monocytogenes* para su aislamiento. Cuando el inóculo inicial oscila entre 10^4 y 10^2 ufc/ml de caldo de enriquecimiento obtenido a partir de cultivos puros y/o de carne triturada, respectivamente, todas las cepas de *L. monocytogenes* que se utilizaron fueron capaces de alcanzar concentraciones de 10^7 y 10^9 ufc/ml después de 24 horas de incubación a 30°C.

El método de enumeración para la *Listeria* spp. ha sido difícil de desarrollar (Blywick-Mckennal y Schaffner, 1994) debido a la baja concentración de *Listeria* spp. y a la alta concentración de la flora competitiva que se encuentra en los alimentos. El método del número más probable (NMP) se utiliza normalmente para la determinación de coliformes en alimentos, y es útil cuando hay un número bajo de microorganismos.

Para la identificación de la *L. monocytogenes* se puede utilizar el sistema comercial API el cual identificó el 85% de las especies y subespecies de *Listeria* sin necesidad de tests complementarios (Bille y col., 1992). Este test diferencia *L. monocytogenes* de *L. innocua* basándose en la presencia o ausencia de la arilamidasa (DIM test), la hidrólisis de la esculina, la presencia de α -manosidasa, y la producción de ácido a partir de D-arabitol, D-xilosa, L-rhamnosa, α -metil-D-glucosa, D-ribosa, glucosa-1-fosfato y D-tagatosa, y, finalmente, a partir de la hemólisis que distingue *L. monocytogenes* (hemolítica y patógena) de *L. innocua* (no hemolítica y no patógena), las cuales son las dos especies mayoritarias aisladas más frecuentemente a partir de los alimentos. Este sistema reduce considerablemente el tiempo necesario para la identificación convencional, dando resultados fiables a partir de las 18 a 24 horas.

El test API Listeria contiene tres nuevos marcadores: fermentación de la D-tagatosa para *L. welshimeri*, glucosa-1-fosfato para *L. ivanovii*

(reemplazando el CAMP test con *R. equi*), y el DIM test (evitando la necesidad del CAMP test con *Staphylococcus aureus*). El DIM test está basado en la detección de la arilamidasa, que está presente en las cepas de *L. innocua* y en la mayoría de las otras cepas no-*L. monocytogenes* pero que está ausente en todas las cepas de *L. monocytogenes*. El resultado del DIM test para todas las cepas que se analizaron ha sido inequívoco (Bille y col., 1992). Con el DIM test todas las cepas de *L. monocytogenes*, incluso las cepas atípicas no hemolíticas, han sido claramente diferenciadas de la *L. innocua*.

3.2 Salmonella

En los procedimientos de detección de *Salmonella* hay una serie de pasos que se deben seguir. Incluyen un preenriquecimiento en medio líquido, un enriquecimiento en medio líquido, una diferenciación selectiva en placa, un aislamiento, una caracterización bioquímica y finalmente, una confirmación serológica de la bacteria aislada (D'Aoust y col., 1992b; NF ISO 6579, 1993)

El preenriquecimiento de la muestra alimenticia se realiza en un caldo de cultivo no selectivo para facilitar la recuperación de los daños o estrés que haya sufrido la bacteria que se encuentra en los alimentos crudos y procesados. El enriquecimiento selectivo directo (sin preenriquecimiento) y el posterior recuento directo de la bacteria se puede realizar en aquellas muestras de alimentos que sabemos que son sospechosos o que conozcamos el contenido de microorganismos (D'Aoust y col., 1992a). Para esta fase se utilizan los caldos de lactosa o aguas de peptonas que son los medios preferidos por las agencias americanas e internacionales (D'Aoust, 1980), los cuales no tienen función de inhibir, sino que permiten el crecimiento de toda la flora microbiana presente en la muestra incluyendo a *Salmonella*.

El proceso de enriquecimiento está diseñado para inhibir el crecimiento de otros organismos diferentes a la *Salmonella* potenciando así su crecimiento, que se consigue mediante la utilización de inhibidores químicos, como el

selenito y el tetrionato, y con temperaturas de incubación de 41°C-43°C durante 16 a 24 horas. Normalmente se utilizan caldos selectivos que incluyen en su composición tetrionato con verde brillante (TBG), selenito con cisteína (SC), y cloruro magnésico verde malaquita de Rappaport-Vassiliadis (RV) que favorecen el crecimiento de *Salmonella* spp. y provocan la represión de la microflora competitiva (D'Aoust y col., 1992a, 1992b, 1995; NF ISO 6579, 1993). Las condiciones de tiempo y temperatura aplicados durante esta fase de enriquecimiento son más críticos que los elegidos en los medios de preenriquecimiento no selectivo (D'Aoust y col., 1992a, 1992b).

En los productos del pollo contaminados naturalmente, la mejor combinación para asegurar la máxima recuperación de las cepas de salmonela es la utilización del caldo RV (Rappaport-Vassiliadis) y caldo KIMAN (Whitley Impedance Broth suplementado con 20 mg/l de sal sódica de novobiocina, 10 mg/l de oxalato verde malaquita y 40 mg/l de yoduro potásico). El caldo KIMAN puede ser considerado una buena alternativa para el caldo SC, ya que ambos se utilizan a 37°C, y el caldo KIMAN es menos tóxico para el medio ambiente y más eficiente que el SC. De todas formas una combinación de caldo RV y caldo KIMAN puede ser recomendado para la máxima recuperación de *Salmonella* a partir de los productos del pollo (Blivet y col., 1997).

El aislamiento y la identificación de *Salmonella* se realiza a través de cultivos sólidos selectivos en placas de Petri. Los agentes selectivos más comúnmente utilizados en estos medios de cultivo son las sales biliares, el desoxicolato, el verde brillante, el sulfito de bismuto y los antibióticos (NF ISO 6579, 1993)

La diferenciación de *Salmonella* de otros microorganismos se consigue a través de los cambios de color con indicadores de pH, presentes en los medios de cultivo, al responder a las fermentaciones de la lactosa o la sacarosa, dependiendo todo ello de la producción de SH₂ o de la descarboxilación de la lisina. Normalmente, los medios de cultivo sólidos selectivos más utilizados son el verde brillante con o sin sulfadiacina o

sulfapiridina, el desoxicolato de lisina xilosa, el sulfito de bismuto, el agar entérico Hektoen, el agar MacConkey, el desoxicolato citrato y el agar Salmonella-Shigella (ICMSF, 1996).

El aislamiento de *Salmonella* se realiza principalmente mediante dos medios de cultivo sólidos específicos: el agar TSI (agar triple azúcar hierro) y el agar LIA (agar lisina hierro). Una vez aislada la bacteria con estos medios de cultivo, la caracterización se completa con un test bioquímico completo.

El último paso en la identificación de la *Salmonella* es el test serológico. Este se basa en la capacidad de aglutinación de la bacteria frente a determinados antisueros específicos de los antígenos somático (O), flagelar (H) y capsular (Vi).

4. CARACTERÍSTICAS ECOLÓGICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS

4.1 *Listeria*

El género *Listeria* tiene un amplio espectro de distribución ambiental, siendo aislada en una gran variedad de hábitats, como aguas residuales, barros de aguas residuales, agua, tierra, ensilados, vegetales, carnes crudas y heces de animales y personas sanas. Podríamos decir, por lo tanto, que es ubicua en la naturaleza.

Las diferentes especies de *Listeria*, incluida *L. monocytogenes*, se pueden aislar regularmente del suelo y de las plantas, dando un resultado positivo a la identificación de *L. monocytogenes* que puede variar desde el 9% hasta el 44% (Weis y Seeliger, 1975; Skovgaard y Morgen, 1988).

Las muestras fecales de terneros están contaminadas en un 68% con *Listeria* spp., y un 52% con *L. monocytogenes*. En las muestras fecales de pollo un 33% contienen *Listeria* spp. y otro 33% contiene *L. monocytogenes* (Skovgaard y Morgen, 1988).

El alto porcentaje de muestras positivas a *Listeria* en piensos se corresponde con un alto porcentaje de muestras positivas en las heces de ternera. El 82% de las muestras analizadas de pienso contenían *Listeria* spp. y el 62% *L. monocytogenes*. El aislamiento de las diferentes especies de *Listeria* en piensos varía desde un 67% hasta un 100%. *L. monocytogenes* fue aislada a partir de los ensilados y de la paja con pH alcalinos en un 62% y un 67%, respectivamente (Skovgaard y Morgen, 1988; Cox y col., 1989).

La contaminación de los vegetales con *L. monocytogenes* se produce en el campo. El almacenamiento prolongado en frío de los vegetales y la ausencia de cocinado de los mismos hace que la ingestión de estos productos contaminados produzca una colonización del tracto gastrointestinal de las personas más susceptibles. La práctica habitual de conservar en frío durante cierto tiempo a los vegetales después de su distribución por los mayoristas, puede permitir que un inóculo inicial pequeño de *L. monocytogenes* prolifere, o bien que el frío cause la muerte de los microorganismos competitivos favoreciendo su crecimiento (Schlech y col., 1982). La incidencia de *L. monocytogenes* en productos vegetales congelados es de un 2,2% y la de *Listeria* spp. es de un 20% (Aguado y col., 1997)

En el caso de la leche, la contaminación se produce durante el ordeño (Skovgaard y Morgen, 1988; Cox y col., 1989). Los brotes epidémicos ocasionados por *L. monocytogenes* se han asociado al consumo de productos lácteos como quesos curados tradicionales, quesos blandos, quesos de tipo Cheddar y en quesos de tipo Camembert (Rijpens y col., 1997).

Aguado y col. (1997) encontraron una incidencia del 44,4% de *L. monocytogenes* y del 22,2% de *Listeria* spp. en muestras de salmón ahumado envasado al vacío y conservado en refrigeración adquiridas en supermercados españoles durante 1996.

Skovgaard y Morgen (1988) detectaron que un 67% de las muestras de carne picada de vacuno estaban contaminadas con *Listeria* spp., y que un 28% de ellas con *L. monocytogenes*. Las muestras fueron recogidas en carnicerías y supermercados de Copenhage (Dinamarca) a través de los controles rutinarios que ejerce la administración danesa.

Aguado y col. (1997) encontraron una incidencia del 5,5% de *L. monocytogenes* y del 25,9% de *Listeria* spp. en productos cárnicos cocidos en lonchas envasados comercialmente y adquiridos en supermercados durante 1996.

Diversos autores indican que la carne de ave presenta entre un 47 y un 60% de muestras positivas a la identificación de *Listeria* spp. En la piel del cuello del pollo un 94% fueron positivas y de ellas un 47% eran *Listeria monocytogenes* (Skovgaard y Morgen, 1988; Franco y col., 1995; Rijpens y col., 1997; Uyttendaele y col., 1997).

Uyttendaele y col. (1997) realizó un estudio en mataderos de aves de Bélgica y Francia sobre la presencia de *L. monocytogenes* en las canales de pollo. Encontró una incidencia del 32,1% en 1992 y del 27,2% en 1993. En 1994 se redujo hasta un 12,8% y en 1995 a un 9,5%.

La incidencia de *Listeria* spp. en los productos del pavo es del 26,3%. La prevalencia de *Listeria* spp. en tres puntos distintos del proceso de carnización del pavo (inmediatamente después del enfriamiento, después del envasado y a nivel del despiece) fue de un 4,4%, 13,3% y 23,3%, respectivamente (Rijpens y col., 1997).

La prevalencia de *Listeria* spp. en las manos y los guantes de los manipuladores de alimentos derivados del pavo tras las fases del enfriado, en el proceso de despiece de canales y en el envasado de las piezas fue del 16,7%, 33,3% y 40,0%, respectivamente (Genigeorgis y col., 1990).

Las canales de pollo se contaminan con *Listeria* mayoritariamente a través de las superficies, de los utensilios, del equipo de procesado y debido a la

contaminación cruzada. *L. monocytogenes* se ha aislado en el 50% de las canales de pollo preparadas para cocinar antes de ser envasadas (Hudson y Mead, 1989; ICMSF, 1998).

Las piezas del pollo que se encontraron más contaminadas fueron la carne de las patas y la piel, con un 96% de muestras que contenían *Listeria* spp. Las patas del pollo fueron encontradas como las partes más contaminadas en comparación con las alas y las pechugas. Estos resultados sugieren que la carne de las patas y la piel son los responsables de la mayoría de las canales de pollo contaminadas, y que cualquier superficie que entre en contacto con estas piezas puede jugar un papel importante en la distribución de la *Listeria* spp. (Franco y col., 1995).

La presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos precocinados ("ready-to-cook") obtenidos a partir de pollo crudo tiene su origen en la alta prevalencia de *Listeria* en las aves que excretan el microorganismo por vía fecal, provocando una contaminación de las canales durante el proceso de evisceración. La contaminación de la carne constituye un riesgo de contaminación cruzada con otros alimentos (Skovgaard y Morgen, 1988; ICMSF, 1998).

En los alimentos precocinados ("ready-to-cook") de origen aviar *Listeria* spp. se encontró en el 35,5% de las muestras de pollo, mientras que *L. monocytogenes* se encontró en el 15,5%. La incidencia de *Listeria* era mucho mayor en productos de ave no empaquetados, un 41,7%, que en productos preempaquetados, un 11,1% (Rijpens y col., 1997).

Este microorganismo también se puede encontrar en las superficies húmedas de las plantas procesadoras de alimentos que constituyen los reservorios de *Listeria*, lo que combinado con la habilidad de esta bacteria para crecer a temperaturas bajas, da lugar a una elevada presencia de *Listeria* en los refrigeradores y en las unidades de frío. Las superficies de los utensilios y los equipos en contacto con el producto en las fases finales del proceso de carnización tienen una gran importancia como fuentes de contaminación por *Listeria* durante todo el proceso de transformación de los

productos (Franco y col., 1995; Chasseignaux y col., 2001). En las industrias alimentarias las listerias se encuentran de mayor a menor frecuencia en zonas húmedas, suelos, lavamanos, residuos alimentarios y superficies de contacto con los alimentos. Estos resultados demuestran que las condiciones de sequedad y la restricción de residuos alimentarios contribuye al control de estos microorganismos (Cox y col., 1989).

L. monocytogenes sobrevive bien en gran variedad de ambientes y en particular en aquellos que son húmedos y con material orgánico deteriorado. Esto, junto con la tolerancia a los agentes conservantes más comunes, tales como el ClNa y el nitrito, y la habilidad de crecer en una amplia gama de alimentos a temperaturas de refrigeración, hace de *L. monocytogenes* un potente microorganismo contaminante durante el procesado de los alimentos (McLauchlin, 1994; Cox y col., 1989). Los brotes epidémicos de listeriosis incluyen tanto a productos curados como a quesos, sugiriendo que este microorganismo es capaz de crecer en concentraciones elevadas de NaCl. *L. monocytogenes* es capaz de crecer en medios con un 10% (w/w) de ClNa y sobrevivir durante un año en soluciones que contengan un 16% (w/w) de NaCl (Seeliger, 1961; Nolan y col., 1992).

El 12% de los manipuladores son portadores de *Listeria* spp., y el 7% son portadores de *L. monocytogenes* (Kerr y col., 1993). Las manos de los manipuladores de alimentos tienen un importante papel en la contaminación cruzada de los mismos. La ausencia de *Listeria* spp. en las manos de los trabajadores de los mataderos debe considerarse como un hecho inesperado. La presencia de *Listeria* spp. en los alimentos se debe a las manipulaciones realizadas por los manipuladores de alimentos. Se observó que el 30% de los trabajadores que estaban en plantas de procesado de carne de pavo eran portadores de *Listeria* spp. en sus manos o guantes, y que el 26,7% de las muestras tomadas de las máquinas de deshuesado de canales de pavo estaban contaminadas con *Listeria* spp. (Genigeorgis y col., 1990; Kerr y col., 1993).

Cuando el nivel de microorganismos es bajo (< 20 ufc/cm²) las bacterias se eliminan con el lavado de las manos, pero cuando hay un gran número de

bacterias este lavado no es eficaz. Las técnicas deficientes de limpieza y de secado de las manos son las responsables de que *Listeria* se encuentre en aquellos individuos cuyas manos pueden estar libres de *Listeria* spp. tras un lavado adecuado. Por lo tanto, son importantes las buenas prácticas de limpieza para los manipuladores de alimentos, y en particular de aquellos que trabajen en establecimientos donde haya carne cruda, ya que son fuentes potenciales de *L. monocytogenes* (Kerr y col., 1993; McLauchlin, 1994).

Un amplio número de alimentos se ha asociado a la transmisión de esta infección. Queso blando, leche pasteurizada, helados, pescado, pescados ahumados, mariscos, carne de pollo cocida, carne de pollo cruda, frankfurt de pavo, salchichas de cerdo y arroz, paté, fiambre de lengua de cerdo, tabletas de alfalfa, setas salteadas, ensalada de col, vegetales crudos, etc. Aunque estos alimentos sean muy diversos, la mayoría de ellos tienen en común un alto grado de procesamiento, con aumentos relativos de la vida comercial del producto o de períodos de maduración que permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* (McLauchlin, 1994). Aunque *Listeria* spp. no es patógena para los humanos, su presencia en los alimentos puede considerarse como un indicador de las condiciones sanitarias de los mismos, ya que algunas especies de *Listeria*, especialmente *L. innocua*, pueden enmascarar la presencia de *L. monocytogenes* debido a la competencia nutritiva para su crecimiento (Rijpens y col., 1997).

En los brotes epidémicos o esporádicos de listeriosis con frecuencia es difícil detectar el modo de contaminación de los productos alimenticios implicados. La contaminación y la supervivencia de *L. monocytogenes* en los alimentos crudos durante el proceso de producción es debido a la tolerancia de la bacteria a las condiciones adversas incluyendo la temperatura, el pH extremo y la presencia de conservantes alimentarios (Kerr y col., 1993).

En la Tabla 3 se reflejan las principales toxiinfecciones alimentarias relacionadas con el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* ocurridos en el mundo a partir de 1981.

Tabla 3. Principales toxiinfecciones alimentarias producidas por *L. monocytogenes* en el mundo a partir de 1981

PAIS	AÑO	Nº CASOS	SEROVAR	ALIMENTO IMPLICADO
Canadá	1981	41	4b	Ensalada de col
U.S.A. (Boston)	1983	43	4b	Leche ?
U.S.A. (California)	1985	142	4b	Queso
Suiza	1983-1987	122	4b	Queso
Reino Unido	1987-1989	300	4b	Paté
Francia	1992	279	4b	Lengua en gelatina
Francia	1993	30?	4b	"Rillettes"
U.S.A. (Varios estados)	1998	20	4b	Hot dog
U.S.A. (Varios estados)	2000	29	4b	"Delicatessen" de carne de pavo
U.S.A. (Carolina del Norte)	2000	12	4b	Queso fresco estilo mejicano

(Adaptación de Catteau, 1993 y C.D.C. 1998, 2000, 2001).

Las principales vías de transmisión de *Listeria* son el contacto directo del hombre con el animal infectado, la infección cruzada durante el periodo neonatal, y la transmisión alimentaria. El periodo de incubación (en la mayoría de los casos es corto): 1 ó 2 días en las lesiones cutáneas, de 5 a 12 días en las infecciones neonatales, y 1 día en los casos de infección alimentaria asociada al consumo de queso blando. Se ha demostrado que en la infección alimentaria el periodo de incubación en algunos individuos es relativamente largo, cercano a los 90 días. No se sabe el porqué de estas diferencias en el período de incubación, pero en el caso de la ingestión oral depende del número de células o de la cepa. La dosis infectiva en las epidemias de listeriosis es alta, superior a 10^3 ufc/g, y puede variar en función de los individuos y de su estado inmunológico. *L. monocytogenes* se ha extendido por todo el medio ambiente, incluso en los alimentos, aunque esté presente generalmente en un número bajo. Esto, junto con las propiedades de los alimentos y a la transmisión de la infección, nos demuestra que la dosis infectiva necesaria en la transmisión a través de los alimentos es alta (McLauchlin, 1994).

Según Duggan y Phillips (1998), el grado de contaminación y la incidencia de *Listeria* varían según el tipo de alimento. En general, las carnes frescas

presentan cantidades < 100 ufc/g, mientras que las carnes procesadas y los productos derivados de las aves presentan concentraciones mayores. Los alimentos de alto riesgo son frecuentemente productos con muchas manipulaciones, preparados para comer directamente, almacenados en refrigeración durante largos períodos de tiempo y contaminados con gran número de *L. monocytogenes* (>100 ufc/g ó ml). Diversos estudios epidemiológicos indican que las dosis de las infecciones humanas están entre 10⁶ ufc/g (Juntilla y Brander, 1989; Duggan y Phillips, 1998) y 10⁹ ufc/g (Azadian y col., 1989; Duggan y Phillips, 1998), aunque para las personas inmunodeprimidas la dosis infectiva es más baja (Barnes y col., 1989; Duggan y Phillips, 1998).

El número de células de *Listeria* presente en los alimentos es bajo en la mayoría de los casos. El principal problema es la multiplicación de *Listeria* spp. durante el almacenamiento, incluso a bajas temperaturas como las de refrigeración (Hof y Rocourt, 1992). El número de *L. monocytogenes* en el queso blando almacenado a 4°C en el laboratorio se dobla cada 30 a 50 horas (McLauchlin, 1994).

La mayoría de las cepas de *Listeria* spp. tienen una capacidad de ataque baja, aunque algunas cepas de *L. monocytogenes* pueden tener una gran virulencia (McLauchlin, 1994). Hay varios niveles de virulencia en las cepas de *Listeria* spp. de acuerdo con el serovar que se trate. Así pues, la cepa de *L. monocytogenes* serovar 4b se ha descrito en el 40-44% de los casos esporádicos de listeriosis en humanos en Suecia y E.E.U.U. en 1989 (Rocourt, 1991; Hof, 1984; Knorz y Hof, 1986; Pine y col., 1991; Hof y Rocourt, 1992). Las dos cepas de *L. monocytogenes*, serovar 4bx y 4b fagotipo 6,7, son los principales responsables de la listeriosis humana en el Reino Unido, representando un 30-54% anual de todos los casos registrados (McLauchlin, 1994). La virulencia de la cepa puede variar de acuerdo con las condiciones de crecimiento (Wirsing y col., 1983; Hof y Rocourt, 1992).

La listeriosis en el hombre es una enfermedad que ha tenido un incremento gradual en su incidencia desde 1967 a 1986, con un pico entre 1987 y

1989, seguido por una disminución hasta llegar a un número similar de casos a los registrados en los principios de los años 80 (ICMSF, 1996). La listeriosis causada por *L. monocytogenes* y vehiculada por los alimentos se ha reconocido durante la última década como una toxiinfección alimentaria emergente. El número de brotes de listeriosis es bajo en comparación con los alimentos contaminados con *Salmonella* o con *Campylobacter* patógenos que dan lugar a mortalidades más altas (10-30%) (Farber y Peterkin 1991; Uyttendaele y col., 1997).

La incidencia de la listeriosis en humanos en el Reino Unido es de 2 a 3 casos por millón de personas (McLauchlin, 1994). Entre 1983 y 1996, en el Reino Unido, el nivel de listeriosis se mantuvo entre 1,6 y 2,7 por millón de personas, lo que significa que la infección afectó a las personas comprometidas inmunológicamente ya que el número de casos asociados a la gestación disminuyó desde un 31% en 1983 hasta un 26% en 1996. La incidencia de infecciones de *L. monocytogenes* en el Reino Unido es baja (116 casos en 1996) si lo comparamos con los casos de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* (29.887 y 43.877, respectivamente), pero el índice de mortalidad es de aproximadamente un 30% en los casos asociados al embarazo (Duggan y Phillips, 1998).

En E.E.U.U., la incidencia de listeriosis en adultos es de 5 casos por millón. La incidencia de listeriosis perinatal varía desde 78 casos por millón a 243 casos por millón de nacimientos vivos. En 1985 se estimaba que la incidencia mínima de la listeriosis en adultos era de 0 a 3 casos por cada 100.000 personas del total de la población, y un caso de listeriosis perinatal por cada 20.000 nacimientos. El índice de mortalidad de la listeriosis adulta es del 25% en edades inferiores a 60 años, y del 41% en adultos de más de 60 años (ICMSF, 1996).

La listeriosis humana más frecuente afecta a las mujeres embarazadas, neonatos y pacientes inmunodeprimidos, afectando al sistema nervioso central y distribuyéndose a través del torrente sanguíneo. En las mujeres no embarazadas y en los individuos sanos puede cursar de forma subclínica o

bien, con más frecuencia, con meningitis o septicemia, mientras que en los animales se presenta con encefalitis o septicemia (McLauchlin, 1994).

La *L. monocytogenes* puede ser detectada en las heces de una parte de la población humana sana, así como en los animales sanos en los que puede aparecer como parte de la flora intestinal normal (ICMSF, 1996).

Un tercio de las infecciones de *L. monocytogenes* en el hombre son perinatales, incluyendo a la mujer embarazada (ya que ésta tiene una cierta alteración de su estado inmunitario que favorece e incrementa su susceptibilidad) y al niño no nato o neonato.

Los síntomas de la infección en los casos perinatales cursan generalmente con fiebre suave en la madre, con o sin gastroenteritis débil, o con síntomas de gripe; pero las consecuencias para el feto o el neonato son mucho mayores e incluso fatales. El feto presenta una infección septicémica generalizada que provoca, en la mayoría de los casos, la muerte intrauterina durante el primer trimestre del embarazo. En infecciones posteriores puede que el niño nazca prematuramente y seriamente enfermo. La septicemia es lo más común en estos casos y, a veces, va acompañada de meningitis. En listeriosis tardías, alrededor de los diez días después del nacimiento, normalmente cursa con meningitis (ICMSF, 1996).

Los dos tercios restantes de infecciones afectan al resto de la población adulta. En este caso, la mayoría de las infecciones causadas por *L. monocytogenes* afecta a la población cuya inmunidad está deteriorada, tales como personas que padecen cáncer, procesos postoperatorios de trasplante de órganos, procesos con tratamiento de corticoesteroides, o enfermos de SIDA (Uyttendaele y col., 1997). Estos pacientes sufren una bacteriemia y, en un tercio de los casos, una meningitis asociada o no a la bacteriemia. Un pequeño porcentaje presenta lesiones locales incluyendo endooftalmitis, artritis séptica, osteomielitis, pericarditis y endocarditis sin síntomas de bacteriemia (ICMSF, 1996).

4.2 *Salmonella*

Salmonella se encuentra distribuida por todo el mundo y es universalmente reconocida como un agente zoonótico. Se han identificado numerosos reservorios animales, y muchos alimentos particularmente los de origen animal, han sido identificados como vehículos transmisores de este patógeno a los humanos y de la extensión a todos los procesos y manipulaciones que se realizan en las plantas industriales y en los hogares.

La distribución ubicua de *Salmonella* en el medio ambiente, su prevalencia en la cadena alimentaria global, su adaptabilidad fisiológica para cambiar según el ambiente, su resistencia a las condiciones adversas, su virulencia, la impredecible patogenicidad de sus cepas invasivas, la prevalencia de los biotipos resistentes a antibióticos, el continuo incremento global de los casos de salmonelosis humana y su impacto económico en la industria alimentaria, hacen necesaria la continuidad de la vigilancia y el control estricto, a todos los niveles, de la producción de alimentos. El importante crecimiento del comercio internacional de alimentos entre países que tienen diferentes niveles de higiene en su industria agroalimentaria y en sus procesos agrícolas produce un problema de salud pública de elevada complejidad. La ubicuidad de esta bacteria asegura la preeminencia de este patógeno en la cadena alimentaria global y su importancia como agente causante de toxiinfecciones alimentarias (D'Aoust, 1994; ICMSF, 1998).

La contaminación del medio ambiente con *Salmonella* es debido exclusivamente a la transmisión de la bacteria a través de las heces contaminadas, ya sea a través de aguas residuales de animales infectados o bien por las heces infectadas que puedan contaminar las aguas. Las aguas residuales pueden contener gran número de *Salmonella* y si estas aguas se utilizan con fines agrícolas se puede diseminar con gran facilidad. Cuando *Salmonella* se introduce en un hábitat puede permanecer viable durante muchos meses (ICMSF, 1996, 1998).

La *Salmonella* vive en el tracto intestinal de los animales infectados incluido el hombre y se excreta a través de las heces, pudiendo permanecer viable

en el material fecal durante años fuera del huésped y transmitirse a los humanos a través del contacto de las manos con los animales o con todo aquello que haya sido contaminado por las heces, ya sea la paja de los lechos de los animales, la comida, las patas, el suelo e incluso su piel. La comida, los piensos y el agua son los vehículos primarios. La contaminación por *Salmonella* puede extenderse a todo un rebaño de animales durante el transporte al matadero, o bien en las cuadras del mismo durante el período de descanso de los animales antes del sacrificio (ICMSF, 1996). La carne, la carne de ave de corral, los productos lácteos, el contagio persona-persona y el contagio animal doméstico-persona son algunas de las principales causas de los brotes epidémicos producidos por *Salmonella* (Khakhria y col., 1997).

Los alimentos de origen animal se contaminan a través de los equipos sucios con material fecal y por ambientes contaminados de los mataderos. La contaminación cruzada se produce por el contacto de los alimentos crudos durante todo su proceso de elaboración con alimentos o utensilios contaminados con *Salmonella*, pudiendo ésta permanecer y multiplicarse en los equipos y en el ambiente de cualquier proceso de manipulación y/o procesado de alimentos (ICMSF, 1996, 1998).

En raras ocasiones *Salmonella* está presente en las carnes que provienen de animales enfermos con cuadros clínicos de septicemia, pero sí que se encuentra en la superficie de las carnes que han estado en contacto con contenidos intestinales infectados, debido a malas manipulaciones durante el proceso de sacrificio en los mataderos. Las contaminaciones entre las canales generalmente son debidas a la entrada en contacto de la carne con utensilios o superficies contaminadas (Brewer y col., 1995; ICMSF, 1996).

Los productos de origen aviar, tanto sus derivados cárnicos como los huevos, son los principales vehículos de transmisión de *Salmonella* a los humanos (Carramiñana y col., 1997; Khakhria y col., 1997). Los cambios en los hábitos alimenticios, los catering a gran escala, y el incremento del comercio mundial de alimentos y de ingredientes de alimentos han contribuido en gran manera a que se observe un incremento significativo de

los brotes epidémicos, siendo la salmonelosis la enfermedad líder en brotes de toxiinfecciones alimentarias en Europa y en E.E.U.U.(ICMSF, 1996).

Las infecciones producidas por *S. hadar* en humanos están normalmente relacionadas con el consumo de pollos y pavos. Entre 1973 y 1974, *S. hadar* se expandió por los corrales de la mayoría de los criaderos de pavos del Reino Unido y se extendió a través de los centros de cría de todo el país. Esta expansión fue acompañada por un rápido incremento de la prevalencia de la bacteria entre la población humana. La exportación de pavos de cría del Reino Unido hacia Canadá y E.E.U.U. hizo que se incrementara rápidamente el aislamiento de *S. hadar* entre los humanos estando asociado al consumo de pavos y pollos en ambos países. En 1990, *S. hadar* se aisló del 33% de los corrales de pollos, siendo el serovar más común, y en los corrales de pavos es la segunda bacteria aislada (Khakhria y col., 1997).

Las cepas de *S. enteritidis* se aíslan en los corrales de pavos y de otras aves de corral. *S. tiphimurium* es el serovar más comúnmente aislado en terneros y en cerdos. Durante los últimos cinco años ha habido una disminución del número de aislamientos de *S. tiphimurium* en humanos (< 25-30% de los casos descritos en Canadá) que puede deberse a la disminución del consumo de carne de ternera y cerdo, y al incremento del consumo de carnes de ave de corral (Khakhria y col., 1997).

Durante el período de 1983 a 1992 en Canadá, los serovares de *Salmonella* más comúnmente aislados en humanos fueron *S. typhimurium* y *S. hadar*. El tercer y el cuarto serotipos más comunes fueron *S. enteritidis* y *S. heidelberg* (Khakhria y col., 1997). Desde 1989 hasta 1994 en España, *S. enteritidis* ha estado implicada en el 80% de las toxiinfecciones descritas y provocadas por este microorganismo (Carramiñana y col., 1997)

S. pullorum y *S. gallinarum* son las principales responsables de síndromes gastroentéricos con una elevada mortalidad en los pollos y en las gallinas, siendo estas bacterias altamente específicas a la especie, por lo que su patogenicidad para los humanos es muy baja. Durante las últimas décadas, ciertos fagotipos de *S. enteritidis* han provocado graves problemas en la

cría de pollos, en la cría de polluelos y en la producción de huevos, debido a una transmisión ovárica. Las infecciones humanas debidas a estos fagotipos se han incrementado en muchos países en los últimos años. Así, los pollos, los pavos, las ocas y los patos son el reservorio animal más importante de *Salmonella* spp. (ICMSF, 1996).

Las canales de pavo y de pollos están frecuentemente contaminadas por *Salmonella* que llega a la canal del animal a través del contenido del tracto intestinal o del material fecal retenido en las patas o en las plumas. Un 30% del material fecal del interior del animal, un 60% de las canales de pollo refrigeradas, y un 80% de los hígados refrigerados están contaminados por algún tipo de bacteria del género *Salmonella* spp. (Carramiñana y col., 1997).

Los serotipos de *Salmonella* aislados en las heces de los animales vivos se encuentran en las canales de pollo y en los hígados. Todo ello nos indica que hay una contaminación cruzada entre las canales de pollo y la microflora endógena de las heces de las aves. Las contaminaciones cruzadas son un gran problema debido a las características del sacrificio de estos animales, siendo críticos los siguientes pasos: el desplumado, la evisceración y el enfriamiento. La contaminación cruzada provocada por las manos de los manipuladores, por el equipo y por los utensilios utilizados durante el sacrificio pueden extender la bacteria hasta las canales o los trozos de canales sin infectar (Carramiñana y col., 1997; ICMSF, 1998).

La incidencia de *Salmonella* en canales de pollo puede variar desde un 56,7% en el inicio del proceso de carnización, hasta llegar a un máximo del 70% al final del proceso (Carramiñana, 1997).

Los huevos pueden infectarse con *Salmonella* de dos formas distintas: bien por la vía transovárica a partir de gallinas infectadas (también sucede en patos y en pavos), o bien por la penetración de la bacteria a través de la cáscara y de las membranas del huevo. La superficie de la cáscara puede contaminarse en la cloaca del animal o por exposición del huevo en ambientes contaminados con materiales fecales. Los productos del huevo

deshidratados y congelados que no hayan sido pasteurizados son un importante vehículo para diseminar la *Salmonella*. Los huevos que se utilizan como ingredientes en industrias de pastelería o del helado o en los hogares son uno de los vehículos de transmisión más importantes (ICMSF, 1996).

Las frutas frescas son vehículos de transmisión de *Salmonella* con una incidencia entre un 5,4% y un 11%. Las especias también son un reservorio de *Salmonella* spp. Datos de la última década indican que la prevalencia de *Salmonella* en la pimienta importada de Brasil y de otros países asiáticos tiene niveles de contaminación de un 6,7% a un 13,8%. Estas son frecuentemente utilizadas en la preparación de alimentos donde su adición puede ser peligrosa para la salud (D'Aoust, 1994).

Los productos lácteos también figuran en un puesto importante como agentes transmisores de *Salmonella*. En los últimos años se han descrito muchos episodios de salmonelosis humana debido al consumo de queso contaminado. El queso tipo Cheddar ha sido el responsable de las dos mayores toxiinfecciones en E.E.U.U. (1976) y Canadá (1984), donde *S. heidelberg* y *S. typhimurium* fueron las responsables de 339 casos en E.E.U.U. y 2700 casos en Canadá (Fontaine y col., 1980; D'Aoust, 1994). En Suiza y en el Reino Unido se identificaron como causantes de toxiinfecciones alimentarias por *Salmonella* dos quesos tiernos elaborados con leche cruda no pasteurizada (Sadik y col., 1986; Maguire, 1993; D'Aoust, 1994). Una toxiinfección masiva en varios estados de E.E.U.U. fue causada por *S. enteritidis*, en los que contaminó helados producidos durante el verano de 1994. Esta toxiinfección afectó aproximadamente a 224.000 personas con una tasa de afectados del 6,6% (Hennessy y col., 1996; Vought y Tatini, 1998).

Algunos serovares, como *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi C*, y *S. sendai*, son específicos del hombre y normalmente cursan con un síndrome de septicemia tifoïdal. Otros serovares causan síndromes gastroentéricos provocados por la ingestión de alimentos contaminados. Las infecciones por

Salmonella pueden cursar con tres cuadros clínicos: una gastroenteritis, una fiebre entérica, o una bacteriemia o septicemia (ICMSF, 1996).

El primer cuadro clínico es la gastroenteritis, la cual tiene un período de incubación que puede variar desde las 5 horas a los 5 días. Normalmente la sintomatología aparece a las 12-36 horas posteriores a la ingestión de los alimentos contaminados. Los principales síntomas incluyen diarrea, náuseas, dolor abdominal, fiebres leves y escalofríos. La diarrea puede ser copiosa y se acompaña de una deshidratación severa. También puede cursar, en algunas ocasiones, con vómitos, postración, anorexia, dolor de cabeza, y malestar general. Generalmente la sintomatología desaparece en 2-5 días.

El segundo cuadro clínico es la fiebre entérica, la cual tiene un periodo de incubación que puede variar desde 7 hasta 28 días, dependiendo de la dosis inicial de bacteria ingerida. Como media generalmente es de 14 días. Cursa con malestar general, dolor de cabeza, fiebre alta persistente, dolor abdominal, dolor general del cuerpo y debilidad con constipación. También puede cursar con náuseas, vómitos, tos persistente, escalofríos y anorexia. También se han observado bradicardias, distensión abdominal y esplenomegalia. El periodo de convalecencia es largo y lento, de 1 a 8 semanas.

El tercer cuadro clínico es la bacteriemia o septicemia, provocada por la presencia de *Salmonella* en la sangre. La sintomatología cursa con una fiebre alta y persistente, dolor en la espalda, en el abdomen y en el pecho, escalofríos, transpiración, malestar, anorexia y pérdida de peso. No son comunes pero se han descrito secuelas como apendicitis, artritis, colecistitis, endocarditis, abscesos locales, meningitis, osteomielitis, osteoartritis, pericarditis, peritonitis, neumonías e infecciones del tracto urinario (Archer y Young, 1988; ICMSF, 1996).

En el año 1963, hubo cerca de 20.000 casos de salmonelosis en E.E.U.U.; esta cifra ha ido aumentando cada año hasta los 48.000 casos anuales descritos en el año 1988. Se estima que, en la actualidad, pueden llegar a

4,8 millones de casos al año (ICMSF, 1996). Durante el periodo de 1983 a 1992 se diagnosticó *Salmonella* en un total de 89.760 humanos y 22.551 animales en Canadá (Khakhria y col., 1997). Los valores de incidencia de *Salmonella* spp. en la última década han variado de 17,4 casos a 187 casos por cada 100.000 personas (D'Aoust, 1994).

Se ha descrito que los brotes epidémicos de salmonelosis en los países industrializados tienen una variación estacional a lo largo del año. Así, el pico de brotes se produce durante los meses que hace más calor, en verano. El 40% de los casos de salmonelosis se dan en niños de edades inferiores a los 5 años y el resto en adultos de más de 60 años que padecen enfermedades crónicas, y, en general, en todos aquellos individuos que tienen reducida su respuesta inmunitaria. Estudios demográficos sobre el impacto socioeconómico de las enfermedades demuestran que hay altos índices de salmonelosis en clases sociales económicamente bajas y en áreas de elevada densidad de población (ICMSF, 1996).

El coste de las toxiinfecciones alimentarias producidas por *Salmonella* se ha calculado a partir de los costes directos e indirectos que ha producido la infección. Como costes directos se entiende la investigación epidemiológica, el diagnóstico laboratorial, el tratamiento de los enfermos, las pérdidas económicas por publicidad negativa del responsable de la toxiinfección, la eliminación de los productos sospechosos y los costes legales que se deriven. Como costes indirectos se entienden las compensaciones económicas a los afectados por el dolor, sufrimiento o por pérdida de vidas humanas (ICMSF, 1996).

La dosis infectiva (ID_{50}) para las personas sanas se encuentra entre 10^7 y 10^9 células pero ello depende de diferentes factores. Por ejemplo, en una toxiinfección provocada por un helado contaminado con un número pequeño de *S. enteritidis* pero distribuida homogéneamente en el producto la dosis infectiva causante de la enfermedad sintomática fue sólo de 25 células (Gerba y col., 1996; Vought y Tatini, 1998). En el caso de los individuos susceptibles se puede provocar la enfermedad con sólo 10 bacterias de la cepa apropiada de *Salmonella* (Carramiñana y col., 1997). En alimentos

ricos en grasas y/o azúcares la dosis infectiva puede ser de 10^4 a 10^5 células (D'Aoust y col., 1975; Fontaine y col., 1980; Greenwood, 1983; D'Aoust, 1985; Vought y Tatini, 1998).

Los factores que afectan a la dosis infectiva pueden ser los siguientes: la supervivencia de la bacteria en su paso por el estómago y a la acción de los ácidos gástricos, la virulencia de la cepa de *Salmonella*, la tolerancia o susceptibilidad individual de la persona afectada y su estado inmunológico, y el estado de salud del individuo y su edad (ICMSF, 1996).

Se ha sugerido que la dosis infectiva de *Salmonella* puede estar influenciada por la composición de los alimentos ingeridos y por el tiempo de exposición al microorganismo infectivo. Por ejemplo, los alimentos con un alto contenido en grasa pueden proteger la *Salmonella* contra la acción de las secreciones gástricas debido al encapsulamiento del patógeno en la micela de lípido, facilitando el paso de la bacteria por el estómago hasta el intestino sin ser dañada y facilitar su multiplicación e invadir el intestino y, a partir de aquí, diseminarse por los tejidos (D'Aoust, 1994). La elevada cantidad de grasas y/o azúcares en los productos alimenticios protegen a la bacteria de las barreras gástricas naturales y permiten que la bacteria llegue al intestino donde producirá la enfermedad sintomática (Vought y Tatini, 1998).

5. CARACTERÍSTICAS DE RESISTENCIA, CONTROL Y PREVENCIÓN

5.1 *Listeria*

5.1.1 Temperatura

La temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias del género *Listeria* está entre 30°C y 37°C, aunque los límites de temperatura en los cuales puede crecer o sobrevivir van desde 0,4°C a 45°C. Así, esta bacteria no sobrevive a temperaturas de 60°C durante 30 minutos, pero puede

sobrevivir durante bastantes semanas a -18°C en diferentes substratos alimentarios (Golden y col., 1988; Olsen y col., 1988; ICMSF, 1996).

El estudio del crecimiento de tres cepas distintas de *L. monocytogenes* a temperaturas de refrigeración desde $-0,5^{\circ}\text{C}$ hasta $9,3^{\circ}\text{C}$ en pollos y/o leche UHT, dio como resultado que tras 1 a 3 días a 5°C la concentración bacteriana aumentó un ciclo logarítmico. De igual forma, a 0°C este aumento se produjo entre 3 y 34 días. Los tiempos de generación que se registraron fueron de 13-24 horas a 5°C , y de 62-131 horas a 0°C . Las temperaturas más bajas que permitieron el crecimiento de *L. monocytogenes* en pollo fueron de $-0,1^{\circ}\text{C}$, $-0,4^{\circ}\text{C}$ y $-0,2^{\circ}\text{C}$. El intervalo de temperatura mínimo en el que las cepas de *L. monocytogenes* crecieron fue desde $-0,1^{\circ}\text{C}$ a $-0,4^{\circ}\text{C}$. Estos resultados indican que las temperaturas que se utilizan para refrigerar los alimentos en los establecimientos, de 0°C a 10°C , son incapaces de prevenir el crecimiento de estas bacterias (Walker y col., 1990).

La capacidad de *L. monocytogenes* de sobrevivir a la congelación y al almacenamiento a temperaturas inferiores a -18°C en carnes picadas de pavo y, en general, en todas las carnes, depende de la acidez del alimento, es decir, del pH. El daño que producen las bajas temperaturas a la bacteria se da, en la mayoría de los casos, durante las primeras 24 horas de congelación y este daño permanece constante o bien se incrementa durante los 14 días siguientes. El daño producido por las temperaturas de congelación puede ser reversible en todas las cepas de *Listeria* que se han estudiado si se utilizan caldos reparadores para su recuperación, tales como el caldo TSB y/o LRB. Aunque el daño celular hace perder capacidad infectiva a la bacteria, ésta puede recuperar su capacidad de multiplicación si está sometida a condiciones favorables para su crecimiento (Ray 1979; Flanders y Donnelly, 1994). El pH del alimento es el factor que más influye en la capacidad de *Listeria* para resistir las bajas temperaturas de congelación. Así, valores de pH inferiores a 4,74 hacen que *L. monocytogenes* muestre una disminución en la recuperación de células viables que han sido dañadas por el frío (Palumbo y Williams, 1991; Flanders y Donnelly, 1994).

Los tratamientos por el calor a temperaturas de 70°C durante 2 minutos fueron suficientes para inactivar a *L. monocytogenes* durante la cocción de la carne cruda. Esta resistencia al calor es mayor cuando se trata de productos curados que si se trata de carne cruda, debido, probablemente, a la protección que pueden ejercer las grasas cuando se añaden en los productos curados al incrementar la resistencia al calor (Mackey y col., 1990; Carlier y col., 1996).

En los productos cárnicos curados las fermentaciones que utilizan cultivos estarter que producen bacteriocinas eliminan aproximadamente de 2 a 3,5 \log_{10} ufc/g de *L. monocytogenes* en salchichas de pavo y de pollo, y si añadimos al proceso un tratamiento térmico, podemos reducir adicionalmente de 4 a 5 unidades \log_{10} ufc/g del patógeno (Baccus-Taylor y col., 1993; Luchansky y col., 1992; Roering y col., 1998).

Existe una gran variabilidad de sensibilidad al calor entre las diferentes cepas de *L. monocytogenes*. Un tratamiento eficaz antilisteria sería aquel que destruyese la máxima cantidad de células de la cepa más termorresistente. Así pues, un tratamiento térmico a 72°C durante 15 segundos en la leche (o bien un tratamiento equivalente) destruye el 99,99% de la población de *Listeria* (ICMSF, 1996).

L. monocytogenes es aproximadamente cuatro veces más resistente al calor que *Salmonella* spp. en las carnes picadas. Generalmente, es más tolerante al calor en la carne que en la leche o en el huevo. En carnes contaminadas naturalmente es, aproximadamente, de dos a cuatro veces más sensible al calor que en carnes contaminadas experimentalmente. También es más resistente que muchos otros patógenos a los efectos de los ácidos en combinación con el calor. La resistencia térmica de *L. monocytogenes* en la carne es considerablemente más alta que la de *Salmonella* spp., sin embargo, la temperatura de destrucción de *Salmonella* spp. es la que se utiliza para establecer el mínimo térmico en los procesos industriales (Schoeni y col., 1991; Mazzotta, y col., 2001).

5.1.2 pH

Los valores de pH en los que el crecimiento de las listerias está favorecido se encuentran entre valores ligeramente alcalinos a neutros. Así, el intervalo óptimo estaría entre pH 6 y 9. Algunas cepas pueden crecer hasta valores de 9,6 pero, normalmente, a pH inferiores a 4,6 todas las cepas de *Listeria* mueren (ICMSF, 1996).

La supervivencia de *Listeria* a pH bajos y con altas concentraciones de sal es altamente dependiente de la temperatura a la que se someta el alimento. El valor mínimo de pH que permite la supervivencia de la bacteria a una concentración inicial de 10^4 ufc/g resultó ser de 4,66 a 30°C (Cole y col., 1990), y tras 4 semanas fue de 4,36 a 10°C y de 4,19 a 5°C. Estos límites están en función de la concentración de sal: bajas concentraciones (de 4% a 6%) aumentan la supervivencia de la bacteria, y concentraciones superiores al 6% la reducen (Gnanou Besse y col., 2000). La concentración óptima de sal para el crecimiento de *L. monocytogenes* a 10°C estaría alrededor de un 2-2,5% (Cole y col., 1990).

La capacidad de *Listeria* para crecer en pH bajos está influenciada por la naturaleza del acidulante. En medios acidificados con ClH, el pH mínimo para el crecimiento es de 4,39 (George y col., 1988), mientras que en zumo de calabaza acidificado con ácido láctico no se detectó crecimiento hasta un pH de 4,8 (Conner y col., 1986). Los ácidos orgánicos son, generalmente, más inhibidores del microorganismo que los ácidos inorgánicos debido a su naturaleza lipofílica (Corlett y Brown, 1980). La efectividad de los ácidos débiles, como los desinfectantes de las superficies y como los conservantes de los alimentos, contra *L. monocytogenes* está influenciada por el pH (Cole y col., 1990; Oh y Marshall, 1996; Blom y col., 1997).

5.1.3 Actividad de agua (a_w)

El límite de los valores de actividad de agua que afectan al crecimiento de las bacterias del género *Listeria* es de, aproximadamente, 0,90 a 30°C cuando se utiliza el glicerol para controlarla (Farber y col., 1992). Las

actividades de agua bajas con temperaturas de 4°C aumentan el efecto bacteriostático (Tapia de Daza y col., 1991).

Según Nolan y col. (1992) *L. monocytogenes* es más resistente en condiciones de osmolaridad altas. El crecimiento de *L. monocytogenes* con actividad de agua entre 0,924 y 0,921 es muy reducido, y su tiempo de generación a 0,924 es aproximadamente de 62 minutos. La actividad de agua mínima para el crecimiento de *L. innocua* es ligeramente más alto, entre 0,929 y 0,924. Según parece, *L. innocua* tolera una actividad de agua menor que *L. monocytogenes*. La actividad de agua mínima para que *L. monocytogenes* crezca en un medio ajustado con sucrosa está entre 0,925 y 0,920. Se ha detectado una pequeña diferencia entre la mínima actividad de agua que las dos especies necesitan para crecer cuando se utiliza el glicerol como humectante: 0,911 en el caso de *L. monocytogenes* y entre 0,904 y 0,897 en el de *L. innocua*.

5.1.4 Vacío

Durante el almacenamiento bajo refrigeración de los productos cárnicos envasados al vacío se puede producir el desarrollo de *L. monocytogenes* que aumenta aproximadamente, en una potencia de 10 a 2°C y de 2 a 4 potencias de 10 a 4°C. A 7°C el crecimiento comienza a los 3 días y alcanza en la primera semana de almacenamiento, 100 veces el recuento inicial. Por lo tanto, en el almacenamiento a temperaturas de 6°C a 7°C (temperatura aproximada de un refrigerador domestico) de un producto cárnico envasado al vacío y contaminado con *L. monocytogenes*, cabe esperar que con una carga inicial no superior a 10 ufc/g, la carga microbiana del producto en el momento de ser consumido puede llegar a recuentos de *L. monocytogenes* superiores a 10⁴ ufc/g (Schmidt y Kaya, 1991).

5.1.5 Altas presiones

La principal característica de las altas presiones es la de ser un proceso no térmico capaz de destruir a los microorganismos sin que haya una alteración de las características organolépticas y nutricionales de los

alimentos, y de proporcionar salubridad y durabilidad a los mismos. Sin embargo, este proceso tiene algunas desventajas. A altas presiones el proceso puede no ser económico para su uso comercial debido al alto coste de los equipos y al incremento de fatiga de los elementos metálicos de las instalaciones. Además, la textura y el color de algunos alimentos pueden ser alterados y algunas esporas de bacterias pueden ser resistentes a este proceso (Kalchayanand y col., 1998a; Alpas y col., 1999; Garriga y col., 2002).

Estudios realizados por Kalchayanand y col. (1998a,1998b) y Simpson y Gilmour (1997b) han revelado que:

- (i) La viabilidad de las células disminuye con el incremento de la presión y el tiempo.
- (ii) Por encima de 200 MPa (milipascales), incluso después de 30 minutos, la muerte celular es ≤ 1 logaritmo.
- (iii) Los datos de mortalidad celular no corresponden a una cinética de primer orden, pero por encima de 275 MPa estos valores tienen una fase inicial exponencial.
- (iv) Las bacterias Gram negativas tienen mayor sensibilidad que las bacterias Gram positivas, y en ambos grupos hay diferente sensibilidad a la presión según las especies y/o cepas que se traten.
- (v) La viabilidad de este proceso es menor en un alimento que en un tampón de fosfato.

En general, la destrucción celular se incrementa cuando aumenta la presión, el tiempo de presurización y la temperatura. Las bacterias Gram negativas y las células en fase de crecimiento exponencial son, respectivamente, más sensibles que las bacterias Gram positivas y las células en fase estacionaria (Kalchayanand y col., 1998a; Alpas y col., 1999; Garriga y col., 2002). Así, las células desarrollan proporcionalmente una mayor sensibilidad a la presión cuando ésta se incrementa hasta valores superiores a 276 MPa y la temperatura se incrementa por encima de 35°C (Kalchayanand y col., 1998a).

Hay estudios que demuestran que las células bacterianas son menos sensibles a la presurización entre 20°C y 30°C, pero que a temperatura superior a 35°C empiezan a ser extremadamente sensibles (Carlez y col., 1992; Ludwig y col., 1992; Kalchayanand y col., 1996, 1998b). Una combinación de presión hidrostática moderada (como 345 MPa) y una temperatura de 50°C se pueden utilizar para obtener una disminución de la viabilidad de los patógenos en más de 6 logaritmos. La incorporación de otros parámetros, como la presencia de bacteriocinas durante la presurización puede acentuar esta disminución (Alpas y col., 1999).

El efecto de las altas presiones en los microorganismos depende en primer lugar del daño que se pueda causar en la membrana celular, lo cual provoca un incremento de su permeabilidad y en última instancia, la muerte de la célula (Murano y col., 1999). Cuando se aumenta la presión, los cambios morfológicos progresivos son más evidentes llegando a la lisis celular que sólo aparece con tratamientos de altas presiones. Una disminución del ΔpH ($\text{pH}_{\text{interior}} - \text{pH}_{\text{exterior}}$), del potasio intracelular, del contenido celular de ATP y de los potenciales de membrana quedan demostrados con el incremento de presión (Tholozan y col., 2000).

Las altas presiones destruyen las estructuras terciarias y secundarias de las macromoléculas, tales como las proteínas y los polisacáridos, alterando su estructura y su integridad funcional (Kalchayanand y col., 1998b). La presurización infringe daños subletales en las bacterias, tanto en las células Gram negativas como en las Gram positivas, lo que las hace susceptibles a los compuestos antibacterianos, tales como las bacteriocinas y las lisozimas (Garriga y col., 2002). Se ha demostrado que a 345 Mpa, a 50°C, durante 5 minutos y con bacteriocinas hay una reducción aproximada de 8 logaritmos en la viabilidad de los patógenos (Kalchayanand y col., 1998b).

Aunque las bacterias y los hongos son destruidos a bajas presiones, para destruir las esporas de las bacterias se necesitan presiones mucho más altas. Presiones altísimas pueden incluso inactivar enzimas de los alimentos y alterar su textura, color y propiedades fisicoquímicas, especialmente sus

proteínas y almidón (Hoover y col., 1989; Cheftel, 1992; Hayashi, 1992; Hoover, 1993; Knorr, 1993; Kalchayanand y col., 1998b).

El tratamiento con altas presiones y con calor durante 6 minutos puede reducir hasta $10 \log_{10}$ la población de la cepa de *L. monocytogenes* más resistente a la presión (Murano y col., 1999). La combinación de 344,7 MPa, 50°C y 9,1 minutos puede reducir la viabilidad de esta bacteria hasta 7 logaritmos (Simpson y Gilmour, 1997a; Alpas y col., 1998).

La población de *L. monocytogenes* en el músculo de cerdo se elimina completamente con presiones superiores a 414 Mpa (Murano y col., 1999). El tratamiento de carne picada de cerdo contaminada con *L. monocytogenes* por este proceso, conjuntamente con temperatura de 50°C durante 6 minutos, puede alargar seis veces la vida comercial de este producto (Murano y col., 1999).

En general, la pérdida de viabilidad de *L. monocytogenes* se incrementa con el aumento de la presión, de la temperatura y del tiempo. Presurizaciones de 137,9 y 206,8 MPa durante 30 minutos a 50°C, reducen las poblaciones bacterianas alrededor de 1 y 2 ciclos logarítmicos respectivamente (Alpas y col., 1998).

La resistencia de *L. innocua*, tomada como modelo en lugar de *L. monocytogenes*, a las altas presiones en huevo entero líquido, se estudió a diferentes presiones (300, 350, 400 y 450 Mpa), a diferentes temperaturas (-15, 2 y 20°C) y a diferentes tiempos (5, 10 y 15 minutos), y no fue totalmente inactivada en ninguno de los tratamientos aplicados. La mayor inactivación se consiguió a 450 Mpa a 20°C durante 15 minutos, con una reducción de 5 ciclos logarítmicos (Ponce y col., 1998).

5.1.6 Competencias biológicas

La flora de alteración puede influir en el crecimiento característico de un patógeno en un alimento, debido principalmente a la producción de

metabolitos antimicrobianos por parte de la flora competitiva y por la utilización de los mismos nutrientes.

Las bacterias ácido lácticas, micrococos y *Staphylococcus* coagulasa negativos se aíslan habitualmente durante la fermentación de productos cárnicos (Hammes y col., 1990; Bersani y col., 1991; Villani y col., 1994).

Las bacterias ácido lácticas pueden inhibir el crecimiento de los patógenos durante el proceso de fermentación debido a la síntesis de ácidos orgánicos, diacetil, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Klaenhammer 1988; Piard y Desmazeaud 1991; Villani y col., 1994).

Las bacterias del género *Staphylococcus* coagulasa negativas sintetizan una gran variedad de agentes antimicrobianos tales como enzimas bacteriolíticos, polipéptidos de bajo peso molecular y bacteriocinas que impiden el desarrollo de las bacterias patógenas (Schindler y Schuhardt, 1965; Dajani y Wannamaker, 1969; Gagliano y Hinsdill, 1970; Hsu y Wiseman, 1972; Villani y col., 1994). Así, algunas cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativas son capaces de producir sustancias inhibitoras que son antagonistas para el crecimiento y desarrollo de *L. monocytogenes* (Jetten y Vogels, 1972; Eady y col., 1983; Villani y col., 1994).

El crecimiento de *L. monocytogenes* no se vio influenciado cuando el número de bacterias ácido lácticas era $< 10^7$ ufc/ml. Sin embargo, desde el momento en que las bacterias ácido lácticas tenían una concentración $>10^7$ ufc/ml, se producía un incremento significativo en la concentración de ácido láctico en el medio, y consecuentemente, había un descenso del pH del medio (Devlieghere y col., 2001).

La inhibición de *L. monocytogenes* por bacteriocinas producidas por *Pediococcus acidilactici* pueden servir de control contra este patógeno en los productos cárnicos fermentados. Así, donde la producción de ácido es insuficiente, la producción de bacteriocinas podría facilitar la reducción de la concentración de *L. monocytogenes* (Foegeding y col., 1992). En los productos cárnicos fermentados, los *Pediococcus* spp. producen

componentes ácidos que colaboran en la formación del sabor del producto, y producen pediocinas que tienen una actividad antilisteria (Luchansky y col., 1992). *L. monocytogenes* es sensible a la bacteriocina antilisteria denominada curvaticín 13, producida por *Lactobacillus curvatus* SB13, y que está presente en los productos cárnicos fermentados (Bouttefroy y col., 2000).

5.2 Salmonella

5.2.1 Temperatura

La capacidad de crecimiento de *Salmonella* se reduce sustancialmente si la temperatura es inferior a los 15°C, mientras que el crecimiento de la mayoría de las salmonelas se evita si la temperatura es inferior a los 7°C. Así, el almacenamiento de los alimentos perecederos debe mantenerse por debajo de la temperatura mínima de crecimiento del microorganismo. Se ha descrito la capacidad de *Salmonella* para crecer a temperaturas inferiores a los 5°C, pero en muchos casos no se ha confirmado (D'Aoust, 1994).

La muerte de *Salmonella* es mayor durante el proceso de congelación que durante el tiempo que puede permanecer congelado un alimento. El descenso de la viabilidad de las salmonelas es mucho mayor en el intervalo de temperaturas entre 0°C y -10°C que entre el de -17°C a -20°C (Georgala y Hurst, 1963; ICMSF, 1996). Aunque la congelación puede afectar muy seriamente a la supervivencia de *Salmonella*, no garantiza su destrucción total en los alimentos. Así, durante este proceso, *Salmonella* quedará muy dañada y, por este motivo, en el momento de analizar los alimentos almacenados en congelación se recomienda realizar un proceso de preenriquecimiento.

La muerte de la bacteria se producirá si se excede la temperatura máxima de crecimiento, 49,5°C. Valores situados por encima de ésta serán adecuados para almacenar los alimentos en condiciones de temperaturas elevadas, evitándose el crecimiento de *Salmonella* (ICMSF, 1996). Estos valores quedan reflejados en la Tabla 4.

Tabla 4. Límites de crecimiento de *Salmonella*

Condiciones	Mínimas	Óptimas	Máximas
Temperatura	5,2°C	35°C-43°C	49,5°C
pH	3,8	7-7,5	9,5
aw	0,94	0,99	>0,99

(adaptado de ICMSF, 1996)

Salmonella es muy sensible al calor y la resistencia a este parámetro es muy rara. La resistencia al calor viene influenciada por la actividad de agua, por la naturaleza de los solutos y por el pH del medio. Esta resistencia se incrementa cuando la actividad de agua del substrato se reduce. Si reducimos el pH se reduce la resistencia al calor. También se ha observado que con la misma actividad de agua hay más resistencia al calor si hay sacarosa en el medio que si hay ClNa (ICMSF, 1996).

5.2.2 pH

El pH mínimo de crecimiento es 3,8 y el máximo 9,5. El tipo de ácido presente es muy importante. Los ácidos inorgánicos como el ClH y el ácido cítrico, permiten el crecimiento de *Salmonella* hasta valores de pH cercanos a 4, mientras que el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico, tienen un mayor poder bacteriostático impidiendo el crecimiento de *Salmonella* a pH inferiores a 5 (ICMSF, 1996).

En general, la actividad bactericida de todos los ácidos se incrementa linealmente con la concentración del mismo. De esta forma, concentraciones $\geq 4\%$ de ácido son necesarias para reducir ≥ 2 log el número de células de *S. typhimurium*. Los ácidos orgánicos han sido investigados por su actividad bactericida y porque todos ellos son generalmente reconocidos como seguros; por ello, pueden ser utilizados como conservantes en muchos alimentos. El ácido acético y el propiónico se han encontrado como los que tienen mayor efecto inhibitor de *Salmonella*. El ácido málico y el ácido láctico han presentado una actividad intermedia, y el ácido tartárico y el cítrico tienen una menor actividad inhibitora (Bautista y col., 1997). En general, concentraciones $\geq 2\%$ de ácido

producen reducciones ≥ 7 log ufc/ml (Dickson y Anderson, 1992; Thomson y col., 1967; Tamblyn y col., 1993; Tamblyn y Conner, 1997a, 1997b).

El potencial de óxido-reducción es otro factor importante que afecta al crecimiento de esta bacteria. Aunque *Salmonella* pueda crecer en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, este crecimiento puede verse inhibido por potenciales de óxido-reducción inferiores a -30mV (ICMSF, 1996).

5.2.3 Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua es uno de los factores que más afecta al crecimiento de *Salmonella*. El límite inferior se sitúa en valores de 0,945, pero *Salmonella* puede sobrevivir durante un año o más en alimentos que tengan actividades de agua inferiores, tales como el chocolate, la pimienta negra, las gelatinas o la manteca de cacahuete.

Las sales presentes en los alimentos o añadidas para conservarlos tienen un efecto bacteriostático, ya que las sales captan el agua presente en el alimento haciendo disminuir la actividad de agua e impidiendo el crecimiento de la bacteria. El crecimiento de *Salmonella* en los alimentos se ve inhibido por la presencia de un 3-4% de ClNa. También se inhibe el crecimiento de *Salmonella* si existen concentraciones de sal en carne del orden del 5,3% (ICMSF, 1996).

5.2.4 Altas presiones

Presiones con valores de 500-700 MPa matan rápidamente las células vegetativas de bacterias, levaduras y hongos, aunque las esporas bacterianas son mucho más resistentes. Ciertos enzimas son inactivados y algunas proteínas solubles son desnaturalizadas, pero los compuestos responsables del sabor no se ven afectados. Los tratamientos a altas presiones pueden inactivar los microorganismos a temperatura ambiente sin la utilización de conservantes, permitiendo que se mantengan las características organolépticas (Mackey y col., 1994; Tholozan y col., 2000).

La reducción del número de células viables de *S. thompson* en 10^5 ufc/g fue debido a exposiciones de 250 MPa durante 10 minutos. El tratamiento a 500 MPa durante el mismo tiempo reduce el número de células viables en 10^8 ufc/g (Mackey y col., 1994).

Ponce y col. (1999) estudiaron la destrucción de *S. enteritidis* inoculada en huevo entero líquido a una concentración de 10^7 - 10^8 ufc/ml bajo diferentes condiciones de presión (350 y 450 Mpa), de temperatura (50, 20, 2 y -15°C) y de tiempo (5, 10 y 15 minutos). El índice de inactivación se incrementa con el aumento de la presión y del tiempo de exposición, siendo la destrucción mínima de $1 \log_{10}$ a 350 Mpa y temperatura de -15°C durante 5 minutos e inactivándose totalmente a temperaturas de 50°C (hasta $8 \log_{10}$). El efecto de la presión se vio mejorado y potenciado por temperaturas elevadas.

6. COMPORTAMIENTO DE LISTERIA Y SALMONELLA EN LA CARNE

6.1 *Listeria*

El crecimiento de *L. monocytogenes* está influenciado por muchas condiciones ambientales tales como la temperatura, la actividad de agua, la concentración de ClNa, las condiciones atmosféricas, el pH y la accesibilidad a los nutrientes.

En la carne cruda el pH es el factor determinante para el crecimiento de *L. monocytogenes*, mientras que en la carne cocida, aunque el pH tiene un papel importante en la tasa de crecimiento de *Listeria*, hay otros factores determinantes. Cantidades pequeñas de ClNa tienen un efecto inactivador sobre *Listeria* (McClure y col., 1990; Sorrells y col., 1989; Shineman y Harrison, 1994; ICMSF, 1998).

L. monocytogenes tiene una mayor capacidad de crecimiento en pescado que en carne de ternera y de pollo, y esto se ha demostrado por las diferencias significativas en el tamaño de las poblaciones de *Listeria* después de cierto tiempo, tanto en pescado crudo como cocido, bajo las mismas condiciones de almacenamiento (Shineman y Harrison, 1994). También debe tenerse en cuenta la influencia que sobre el crecimiento de *Listeria*, posee la microflora acompañante. Marshall y Schmidt (1991) han demostrado que la presencia de *Pseudomonas* estimula el crecimiento de *L. monocytogenes* en el pollo.

La inhibición de *L. monocytogenes* en diferentes tipos de tejidos musculares es una compleja interacción entre el pH y otros factores desconocidos, todavía por precisar. La diferencia detectada en la tasa de crecimiento de *L. monocytogenes* puede ser atribuida parcialmente a las inherentes diferencias de pH de los distintos tejidos musculares (Shineman y Harrison, 1994).

Las sales y los nitritos que se encuentran en los productos cárnicos crudos curados afectan a la supervivencia de la *L. monocytogenes*. Generalmente estos productos inhiben el crecimiento y la supervivencia de *Listeria*. Sin embargo, Farber (1989) demostró que se producía un incremento de la resistencia de *Listeria* al calor en salchichas con sales, salmueras y especias. Esto hacía que la temperatura de 68°C no fuera suficiente para reducir los niveles de *L. monocytogenes* por debajo de poblaciones detectables en productos curados de pavo.

Las toxiinfecciones alimentarias producidas por *L. monocytogenes* en los años anteriores a 1989 se asociaban a alimentos como vegetales crudos, ensaladas de col, leche cruda o bien a queso de estilo mejicano, pero fue en 1989 cuando por primera vez se describió un caso de *L. monocytogenes* asociado a productos de aves de corral contaminados, y concretamente al consumo de carne de pavo (Johnson y col., 1990; Line y Harrison, 1992). A partir de este momento, se intensificaron los estudios. Así, Bailey y col. (1989) examinaron 90 muestras de canales de pollos del sudeste de los E.E.U.U. y encontraron que un 23% de las canales estaban contaminadas

con *L. monocytogenes*. En Inglaterra, el 60% de las muestras de aves de corral estudiadas fueron positivas a *L. monocytogenes* (Pini y Gilbert, 1988). Se han descrito casos esporádicos de listeriosis relacionados epidemiológicamente con el consumo de productos de ave de corral cocidos deficientemente y no recalentados suficientemente (Line y Harrison, 1992; Clouser y col., 1995).

Según Clouser y col. (1995) *L. monocytogenes* no ha sido detectada en los pavos en ninguno de los procesos anteriores a la evisceración del animal durante el proceso de carnización. Ninguno de los procesos de desplumado estudiados hasta ahora contribuyen a la presencia de *L. monocytogenes* en la superficie de las canales de pavo. Esto confirma que los diferentes sistemas de escaldado causan diferentes patrones de contaminaciones cruzadas (ICMSF, 1998).

6.2 Salmonella

Las enfermedades producidas por *Salmonella* y asociadas a las aves de corral son una carga elevada para la sociedad, produciendo sufrimientos y pérdida de productividad, además de los costes de producción de los alimentos y de la salud pública. El riesgo está influenciado por las fuentes de este patógeno para las aves de corral, por el modo de invasión en masa durante el procesado de los pollos, por la propagación de *Salmonella* en las granjas, en las plantas de procesado y en los ambientes de las cocinas domésticas, y por la supervivencia del patógeno en la granja y durante el procesado y cocinado de los alimentos (Bryan y Doyle, 1994; ICMSF, 1998).

Los principales factores que contribuyen a las toxiinfecciones alimentarias provocadas por *Salmonella* a través de los alimentos derivados de las aves de corral, según Bryan y Doyle (1994), son:

- 1.- La refrigeración incorrecta de los alimentos.
- 2.- La preparación anticipada de los alimentos.
- 3.- La elaboración inadecuada o el proceso térmico inadecuado.
- 4.- La contaminación de los alimentos por un manipulador enfermo.
- 5.- El recalentamiento inadecuado de los alimentos cocinados.

- 6.- El almacenamiento en caliente de los alimentos.
- 7.- Las contaminaciones cruzadas entre alimentos crudos y cocidos.
- 8.- La limpieza inadecuada de los utensilios que están en contacto con los alimentos.
- 9.- La ingestión de alimentos crudos.

Durante el periodo de 1968 a 1977 en E.E.U.U., las carnes de aves de corral fueron las responsables directas del 54% de los brotes epidémicos, y también fueron las responsables del 8% de los brotes en los que formaban parte de algún alimento como ingredientes (Bryan, 1980). Los pavos fueron responsables de un 13,3% de los brotes epidémicos, mientras que las gallinas lo fueron de un 6,5%.

En otros estudios realizados durante los años 1966 y 1974 en E.E.U.U., los autores concluyeron que las aves de corral eran responsables sólo del 15% del total de los brotes epidémicos. De ellos, los pavos representaban un 62%, y los pollos y las gallinas un 37% (Horwitz y Gangarosa, 1976; Bryan y Doyle, 1994).

Desde 1977 hasta 1984 las aves de corral han sido identificadas en E.E.U.U. como responsables de aproximadamente el 10% de los brotes epidémicos. Los pavos han representado un 56%, mientras que los pollos y las gallinas han representado un 44% (Bryan, 1988). Otro estudio realizado entre 1973 y 1987 en E.E.U.U., demuestra que las aves de corral son responsables del 10,1% de los brotes epidémicos en los que el pavo representa un 5,7% y las gallinas un 4,4% (Bean y Griffin, 1990; Bryan y Doyle, 1994).

En las últimas décadas se han producido en E.E.U.U. entre 15 y 20 casos anuales por cada 100.000 personas (de 40.000 a 50.000 casos). El número de casos en 1994 se estimó entre 740.000 y 4 millones (Chalker y Blaser, 1988; Cohen y Tauxe, 1986; Hauschild y col., 1980; Bryan y Doyle, 1994). Las razones de este incremento en el número de casos no están totalmente definidas, pero se cree que puede ser debido a una suma de factores, tales como: los cambios en las prácticas de manejo de los animales en las granjas; la utilización de piensos contaminados por *Salmonella*; la

utilización de procesos y de procedimientos que permiten y promueven la dispersión y/o crecimiento de la *Salmonella*; el incremento de la población altamente susceptible al patógeno; el aumento de la población que come productos de origen animal crudos o poco cocidos; la mala manipulación de los alimentos durante la preparación de las comidas; y las inadecuadas prácticas de inspección epidemiológica (Bryan y Doyle, 1994; ICMSF, 1998).

Las infecciones por *Salmonella* se producen durante todo el año, pero se detecta un aumento durante el verano y el principio del otoño. Esta variación debe relacionarse con las contaminaciones estacionales de los alimentos y con el crecimiento más acelerado del patógeno cuando las temperaturas ambientales son altas (Bryan y Doyle, 1994; Plachá y col., 2001).

La carne de pavo cocida es un vehículo importante, ya que la carne cruda de pavo está contaminada por bacterias patógenas cuando llega a las cocinas, y esto puede deberse al gran tamaño del producto, el cual requiere un largo tiempo de descongelación, de cocción, de enfriamiento y de recalentamiento. En estas condiciones, es fácil que se produzcan las contaminaciones cruzadas. Así mismo, los pollos son uno de los vehículos más comunes para que, con una contaminación inicial, con un inapropiado cocinado, con una contaminación cruzada y con un enfriamiento inadecuado, se pueda producir una toxiinfección (Bryan, 1980; Bryan y Doyle, 1994; ICMSF, 1998).

Los mecanismos de contaminación de *Salmonella* en las canales de aves de corral se inicia con la retención de la bacteria en la película líquida que hay en la superficie de la piel, desde la cual la bacteria migra hacia la piel y queda atrapada en sus arrugas y grietas. El proceso de retención comienza en los animales vivos y aumenta durante el escaldado en el proceso de carnización (Lillard, 1988; Thomas y McMeekin, 1980 y 1982; Thomas y col., 1987; Bryan y Doyle, 1994; ICMSF, 1998).

El proceso de escaldado abre los folículos de las plumas, hecho facilitado por el proceso de desplumado, lo que mantendrá abiertos los folículos durante todo el proceso hasta el oreo, momento en el que se cerrarán y mantendrán atrapado al microorganismo en su interior. Más tarde, y debido al agua durante el proceso de inmersión, los microorganismos se adherirán alrededor de los polisacáridos y de las fibras de colágeno. Esta adherencia es rápida, con tan sólo 15 segundos de exposición es suficiente (Firstenberg-Eden, 1981; Thomas y McMeekin, 1981; Thomas y col., 1987; Bryan y Doyle, 1994; ICMSF, 1996, 1998; Clouser y col., 1995).

Durante el proceso de evisceración hay una transferencia continua de microorganismos desde las canales a las manos de los trabajadores, a los utensilios y a las superficies de los equipos y, también, hay una transferencia de microorganismos entre las canales. Cuando se corta el tracto intestinal y se elimina de forma manual o bien mecánicamente es fácil que haya una contaminación fecal de las canales. Por lo tanto, el proceso de evisceración es uno de los puntos de contaminación cruzada más importantes en todo el proceso de carnización de las aves de corral (Bryan y Doyle, 1994; ICMSF, 1998).

Durante el lavado por aspersion de las canales, después del eviscerado e inspección, se elimina la mayoría de la materia orgánica y, con ello, algunos de los patógenos, quedando sustituido por una superficie fluida de agua limpia. Durante este proceso, la reducción de la carga bacteriana normalmente es del 90% (Mead, 1982; Bryan y Doyle, 1994; ICMSF, 1998).

La prevalencia de *Salmonella* en los productos derivados de las aves de corral varía desde un 2% a un 100%, siendo la media de un 30%. La concentración de células de *Salmonella* en las canales de pollo normalmente es baja, alrededor de 1 a 30 células, aunque ocasionalmente se pueden encontrar 10^4 ufc/100 g. de piel de pollo (Mulder y col., 1977; Notermans y col., 1975; Swaminathan y col., 1978; Tokumaru y col., 1990; Bryan y Doyle, 1994).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRAS

1.1 Elaboración del producto

Se han estudiado un total de 114 muestras de jamón de pavo curado correspondientes a 4 partidas: 1, 2, 3 y 4.

Para la elaboración de jamón curado de pavo se utilizan pechugas de pavo frescas despiezadas compradas en un matadero de aves autorizado y homologado por la C.E.E.

Se introducen 40 Kg de pechugas de pavo frescas en el interior de un bombo de masaje y se añaden todos los ingredientes (sal, sal de enebro, pimienta negra, azúcar, nitrito, nitrato, ascorbato y humo seco de nogal). La rotación del bombo es de 700 vueltas a una velocidad de 12,5 r.p.m. con todos los ingredientes durante 56 minutos. Para conseguir una mejor homogeneización se programa de manera que después de 5 minutos de rotación repose durante 10 minutos. Al cabo de tres horas se detiene el proceso de masaje y la masa permanece en su interior durante 24 horas. Todo este proceso se realiza en el interior de una cámara frigorífica a temperatura de 4°C a 5°C con vacío en el interior del bombo.

Al día siguiente se añade caseinato sódico a la masa en una cantidad de 1,5% del peso total a una proporción de 1/9 caseinato sódico/agua. La adición de esta dilución de caseinato sódico tiene como objeto conseguir una mayor cohesión entre las fibras cárnicas y obtener un producto compacto. Durante 5 minutos se mantiene el bombo en rotación, para obtener una buena mezcla.

Una vez finalizado el proceso, las pechugas se distribuyeron en bolsas de celofán para formar piezas de 6,5 a 7 Kg. Se ataron las bolsas de celofán y se introdujeron en el interior de una bolsa de plástico al vacío. En este estudio se prepararon 6 piezas (jamones) de cada partida. A continuación se almacenaron en la cámara frigorífica a 4°C durante un mínimo de 14 días y un máximo de 21 días en condiciones de anaerobiosis parcial, apilados

uno encima de otro en el interior de una caja de plástico para darles forma rectangular.

Después de permanecer dos semanas en la cámara frigorífica, cada pieza se introdujo en una malla para poder ser colgadas en el secadero artificial, permaneciendo entre 90 y 100 días a temperatura de 8°-12°C y una humedad ambiental entre el 55% y el 75%. Durante este proceso las mermas del producto fueron aproximadamente del 50%.

Después del proceso de secado, se retiró la malla y la bolsa de celofán utilizadas durante el proceso de elaboración y seguidamente se loncheó a máquina y se distribuyó a razón de 100 g de jamón curado de pavo en envases de polietileno al vacío, tal y como se comercializa este tipo de producto.

1.2 Preparación de las muestras de las partidas nº 1, 2 y 3

Las bacterias utilizadas, en las partidas nº 1, 2 y 3 de jamón de pavo curado, proceden de la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia. Se utilizaron las cepas siguientes:

- *Listeria innocua* CECT 910.
- *Salmonella choleraesuis* CECT 443.

1.2.1 Preparación de los inóculos

Según las instrucciones de la Colección Española de Cultivos Tipo se reconstituyeron las cepas *Listeria innocua* y *Salmonella choleraesuis*. El medio de cultivo líquido utilizado, tanto para las cepas de *Salmonella* como de *Listeria*, fue BHI (Brain Heart Infusion, Scharlau Microbiology).

Con objeto de comprobar la morfología típica de las cepas estudiadas se procedió a su cultivo en medios específicos. El medio de cultivo sólido utilizado para la determinación de *Salmonella* fue SMID (Biomérieux). Para *Listeria* se utilizó el medio ALOA (Agar *Listeria* acc. to Ottaviani and Agosti, Biolife).

La conservación de las cepas se realizó mediante ultracongelación (-20°C) en criobolas.

Para la inoculación de las cepas se prepararon diluciones decimales seriadas en tubos con 9 ml de caldo BHI hasta diluciones de 10^{-7} . La dilución madre se utilizó para inocular la carne fresca de pavo.

Para conocer la concentración del inóculo se sembraron 0,1 ml de los tubos de las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} en medios de cultivo sólidos, SMID para *Salmonella* y ALOA para *Listeria*, incubándose durante 24 horas a 37°C.

1.2.2 Adición de los inóculos

En las partidas 1, 2 y 3 se adicionó sobre la carne fresca de pavo el inóculo constituido por 200 ml de agua destilada estéril más 9 ml de inóculo de *Listeria innocua* y 9 ml de inóculo de *Salmonella cholerasuis* (diluciones madre). El agua destilada estéril es necesaria para una mayor distribución de los microorganismos entre los 40 kg de carne de pavo del estudio.

Las muestras objeto de estudio fueron inoculadas en el momento de introducir las pechugas de pavo frescas en el bombo de masaje junto con los demás ingredientes. El proceso de elaboración fue igual que el comercial.

1.2.3 División de las partidas en lotes

Una vez obtenido el jamón curado de pavo en lonchas y envasado, cada partida se dividió en cuatro lotes distintos que fueron sometidos a diferentes temperaturas y tratamientos de conservación para ver la evolución de los dos microorganismos objeto de estudio a lo largo del tiempo. El producto fue estudiado durante un período de 7 meses, tiempo superior a la fecha de consumo preferente del producto durante su vida comercial (6 meses). Posteriormente, se realizó un análisis a los once

meses de la vida comercial del producto para evaluar la supervivencia de los microorganismos.

Las características de cada lote fueron las siguientes:

- Lote 1: Muestras inoculadas y conservadas al vacío a 4°C
- Lote 2: Muestras inoculadas y conservadas al vacío a 4°C y tratadas con altas presiones.
- Lote 3: Muestras inoculadas y conservadas al vacío a 20°C.
- Lote 4: Muestras inoculadas y conservadas al vacío a 20°C y tratadas con altas presiones.

1.2.4 Aplicación de vacío

La aplicación del vacío de las muestras se realizó con un aparato de vacío a presiones de 15 milibares.

1.2.5 Aplicación de altas presiones

En el tratamiento de las muestras con altas presiones se utilizó un aparato con un recipiente horizontal de presión (Alstom), con un sistema automático de carga y descarga, con 320 litros de capacidad, con 280 mm de diámetro interior y 800 mm exterior, con 18,5 m de longitud y 44.000 Kg de peso, con dos bombas de presión que alcanzan un máximo de 400 MPa.

El proceso de altas presiones dura de 15 a 16 minutos por ciclo. Cada ciclo se compone de: carga y descarga en 30 segundos, presurización de 4 minutos, tratamiento a 400 MPa durante 10 minutos y despresurización de 1 minuto. La temperatura durante todo el proceso es de 12°C.

1.2.6 Protocolo de la recogida de muestras

El total de muestras analizadas en cada una de las partidas fue de 24. De cada una de las muestras se realizaron dos determinaciones analíticas, excepto las muestras 21, 22, 23 y 24. En total, en las partidas 1, 2 y 3, se realizaron 132 determinaciones analíticas de 72 muestras.

El protocolo de la toma de muestras de las partidas 1, 2 y 3 queda reflejado en la Tabla 5.

Tabla 5. Protocolo de la toma de muestras de las partidas 1, 2 y 3

Día	Nº Muestra	Identificación muestra
0	1	Pechuga de pavo fresca
1	2	Pechuga de pavo fresca con <i>L. innocua</i> y <i>S. choleraesuis</i>
21	3	Producto en anaerobiosis parcial a 4°C
63	4	Producto en mitad de la maduración y secado
119	5, 6, 7, 8	Producto loncheado y envasado. Lotes 1, 2, 3 y 4
147	9, 10, 11, 12	1 mes de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4
231	13, 14, 15, 16	4 meses de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4
315	17, 18, 19, 20	7 meses de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4
434	21, 22, 23, 24	11 meses de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4

1.3 Preparación de las muestras de la partida nº 4

Una vez finalizado el análisis de las partidas 1, 2 y 3, se creyó conveniente, para poder confirmar los resultados obtenidos hasta el momento, hacer el estudio de una cuarta partida en la que sólo se inoculó *Listeria innocua* y en la que se estudió la influencia de la flora alterante existente en el jamón curado de pavo en lonchas sobre la supervivencia de este microorganismo.

Después de revisar los resultados microbiológicos obtenidos por la empresa durante los últimos dos años en este tipo de producto se decidió estudiar, además de *Listeria innocua*, los microorganismos que aparecían con mayor frecuencia, como los microorganismos de la flora láctica, *Micrococcus*, mesófilos totales a 30°C, hongos y levaduras.

El material que se utilizó en esta partida fue jamón curado de pavo en lonchas envasado al vacío en envase comercial, con menos de un día de preparación en lonchas y según el proceso normal de producción en fábrica.

1.3.1 Preparación e inoculación del microorganismo

La bacteria utilizada procede de la Colección Española de Cultivos Tipo y fue la cepa *Listeria innocua* CECT 910.

En esta partida, la masa total de materia prima utilizada fue de 1500 g de jamón de pavo curado en lonchas. El inóculo debía ser del 2% de la masa total, es decir, de 30 ml.

En un tubo con 10 ml de caldo BHI se sembró la colonia liofilizada de *Listeria innocua* y se incubó durante 24 horas a 37°C. A continuación, 1 ml de este cultivo se mezcló con 1000 ml de BHI para obtener una concentración microbiana de 10^6 ufc/ml. Se tomaron 1,5 ml y se mezclaron con 28,5 ml de BHI para obtener los 30 ml de inóculo que añadimos a los 1500 g de materia prima, obteniendo una concentración inicial teórica de 10^3 ufc/g.

Se retiró el envase del producto y se introdujo en el interior de una trituradora convenientemente esterilizada. Después de triturarlo se adicionó el inóculo de *Listeria innocua*. Una vez mezclado se introdujeron 25 g del producto en bolsas de estomacher, se envasaron en una segunda bolsa y se realizó el vacío.

1.3.2 División de la partida en lotes

La partida se dividió en 4 lotes que se sometieron a las mismas condiciones de temperatura y conservación que los lotes de las partidas anteriores.

- Lote 1: Muestras inoculadas y conservadas al vacío a 4°C
- Lote 2: Muestras inoculadas y conservadas al vacío a 4°C y tratadas con altas presiones.
- Lote 3: Muestras inoculadas y conservadas al vacío a 20°C.
- Lote 4: Muestras inoculadas y conservadas al vacío a 20°C y tratadas con altas presiones.

A los lotes 1 y 3 se les aplicó el vacío (apartado 1.2.4) mientras que los lotes 2 y 4 fueron tratados con altas presiones (apartado 1.2.5).

1.3.3 Protocolo de la recogida de muestras

El total de muestras analizadas en esta partida fue de 42. De cada muestra se realizaron seis determinaciones analíticas, con un total de 252.

En el protocolo de la toma de muestras de la partida nº 4 se estudió una muestra de cada lote cada 15 días hasta llegar a los siete meses de vida comercial del producto (los análisis de los días 15, 105 y 165 no se realizaron por problemas de agenda o por coincidir en períodos vacacionales de la empresa). Así queda reflejado en la Tabla 6.

Tabla 6. Protocolo de la toma de muestras de la partida nº 4

Día	Nº Muestra	Identificación muestra
0	1	Jamon curado de pavo loncheado y envasado
1	2	Jamon curado de pavo loncheado y envasado con <i>L. innocua</i>
30	3, 4, 5, 6	Producto con 30 días de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4
45	7, 8, 9, 10	Producto con 45 días de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4
60	11, 12, 13, 14	Producto con 60 días de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4
75	15, 16, 17, 18	Producto con 75 días de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4
90	19, 20, 21, 22	Producto con 90 días de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4
120	23, 24, 25, 26	Producto con 120 días de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4
135	27, 28, 29, 30	Producto con 135 días de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4
150	31, 32, 33, 34	Producto con 150 días de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4
180	35, 36, 37, 38	Producto con 180 días de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4
210	39, 40, 41, 42	Producto con 210 días de vida comercial. Lotes 1, 2, 3 y 4

2. DETERMINACIONES FÍSICO-QUÍMICAS

2.1 Determinación de pH

Para medir el pH de todas las muestras utilizamos un aparato Crison modelo 521, con el electrodo xerolyte.

2.2 Determinación de la actividad de agua

La actividad de agua de todas las muestras se determinó con un aparato Aqualab CX-2, cuyo fundamento se basa en medir el punto de escarcha de la muestra (o bien el punto del rocío).

3. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

3.1 Determinación de *Listeria innocua*

Para la investigación y recuento de *Listeria* se utilizó el método descrito por Vlaemynck y col. (2000) y validado por AFNOR (AES 10/3-09/00).

Se tomaron 25 g de muestra y se introdujeron en una bolsa estéril junto con 225 ml de caldo Fraser con el suplemento de crecimiento citrato férrico amoniacal 5%. Se homogeneizó en el estomacher durante 1 ó 2 minutos. A continuación se incubó durante 24 horas a 30°C. Después se sembró en estría en agar ALOA, incubándolo durante 48 horas a 37°C. Pasado este período de tiempo si había *Listeria innocua* crecían colonias de color gris-verde sin halo en el agar. Si fueran *Listeria monocytogenes* serían colonias de color gris-verde con halo en el agar (Tabla 7).

3.1.1 Recuento de *Listeria innocua*

Se tomaron 25 g de muestra y se introdujeron en una bolsa estéril junto con 225 ml de agua de peptona tamponada esterilizada. Se homogeneizó durante 1 ó 2 minutos en el estomacher. Se preparan diluciones seriadas y

se siembra 0,1 ml de las diluciones escogidas en superficie en placas de agar ALOA, distribuyendo la muestra por toda la superficie con un asa de Drigalsky. Después de incubar durante 24 horas a 37°C se cuentan las colonias de color gris-verde sin halo que hayan crecido y se determina el número de ufc/g. Finalmente se realizan las pruebas de identificación (Tabla 8).

3.1.2 Análisis de número más probable (NMP)

Este tipo de análisis solamente se utilizó para aislar e identificar las colonias presuntivas de *Listeria*, según el método descrito por la FDA (Blystick-Mckennal y Schaffner, 1994).

En una bolsa estéril se introducen 25 g de muestra y 225 ml de agua de peptona tamponada estéril y se homogeneizan durante 1 ó 2 minutos. A partir de esta solución se preparan series de tres tubos hasta la dilución 10^{-3} de caldo UVM I con suplemento y se incuban a 30°C durante 48 horas. A continuación se siembra cada dilución en las placas de agar PALCAM que se incuban a 37°C durante 48 horas.

3.1.3 Identificación de *Listeria innocua*

Se identificaron y confirmaron todas las colonias sospechosas crecidas en los medios de cultivo PALCAM y ALOA. Para su identificación se realizan las pruebas siguientes:

- Pruebas de identificación rápidas (pruebas preliminares):
 - (a) KOH: si no da formación de gel se considera positivo.
 - (b) Catalasa: si nos da gas se considera positivo
 - (c) Oxidasa: es negativa si no hay ningún cambio.
 - (d) Movilidad en fresco: se observa en el microscopio.
- Pruebas de identificación lentas:
 - (a) Hemólisis en agar sangre: la lectura se realiza a las 24 ó 48 horas de incubación a 37°C. Hay hemólisis si hay un halo alrededor de la colonia.

(b) Galería de identificación API Listeria (BioMérieux): la lectura se realiza después de incubar durante 24 horas a 37°C.

Tabla 7. Determinación de *Listeria* en medio ALOA

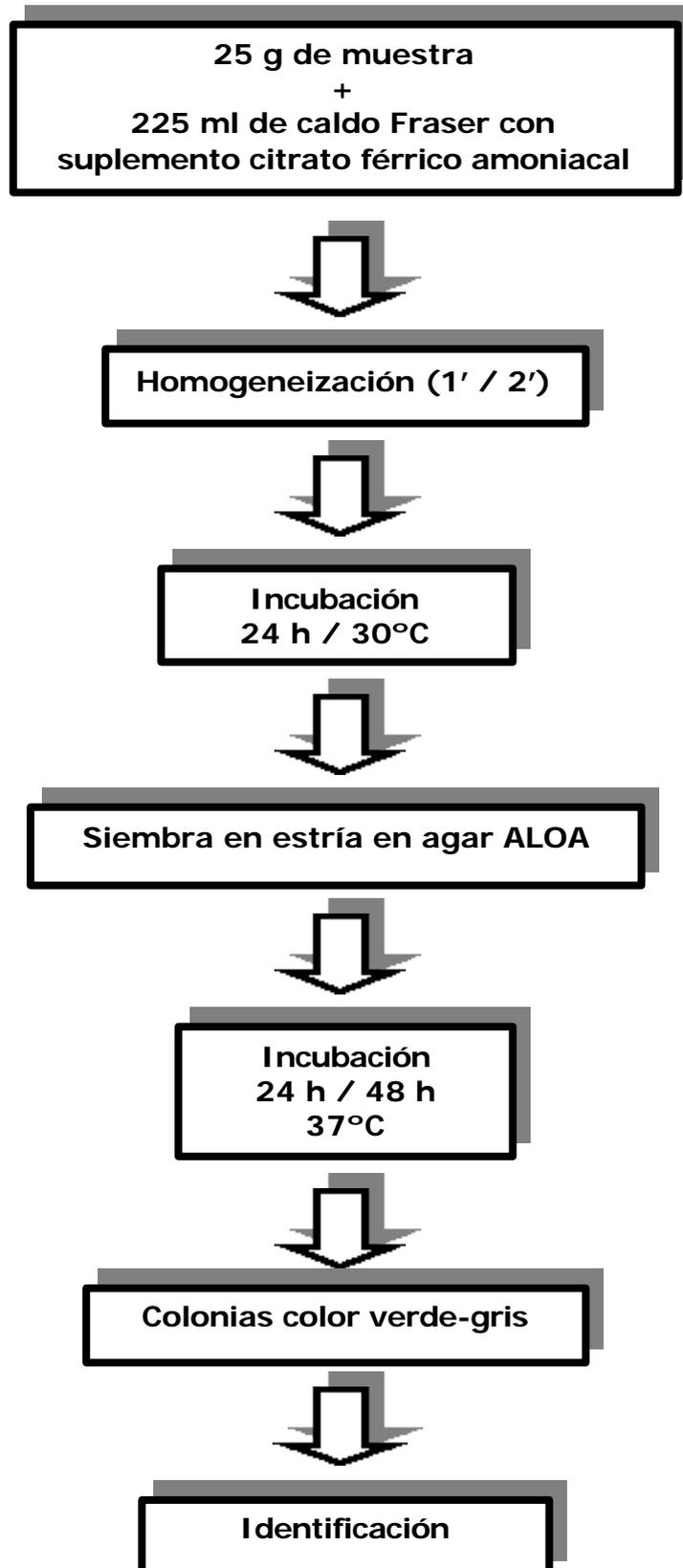
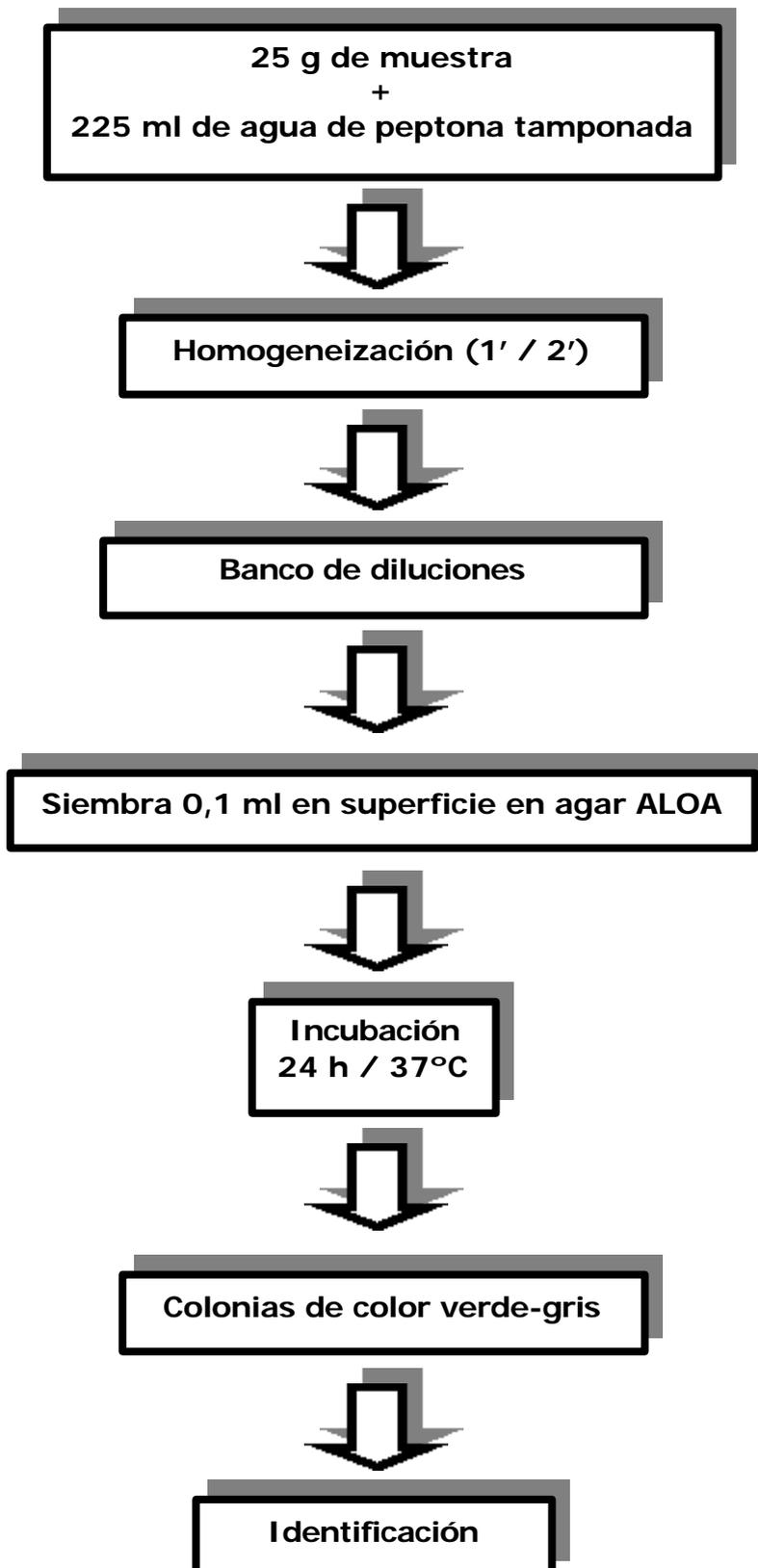


Tabla 8. Recuento de *Listeria* en medio ALOA



3.2 Determinación de *Salmonella choleraesuis*

Para este análisis se utilizó el método descrito en la norma NF ISO 6579; que consiste en mezclar 25 g de muestra con 225 ml de agua de peptona tamponada introducidas en una bolsa estéril y homogeneizadas durante 1 ó 2 minutos. Se incuba durante 24 horas a 37°C. Esta etapa es el preenriquecimiento selectivo.

A partir del preenriquecimiento se siembra 1 ml en 10 ml de medio selectivo Tetrionato Müller-Kaufman incubándose durante 24 horas a 37°C. Del mismo preenriquecimiento se siembra 0,1 ml en 10 ml de medio selectivo Rappaport-Vasiliadis incubándose 24 horas a 42°C. A partir de estos cultivos se siembra en estría en el medio sólido selectivo SMID, incubándose a 37°C durante 24 horas. Pasado este tiempo las colonias presuntivas de *Salmonella* tienen la morfología típica, redondas de bordes lisos regulares de color rosa (Tabla 9).

A las colonias presuntivas de *Salmonella* se las sometió a las pruebas confirmativas bioquímicas siguientes:

- (a) Prueba de la oxidasa
- (b) Galería identificativa API 20 E (BioMérieux) para enterobacterias y otros bacilos Gram negativos.

3.2.1. Recuento de *Salmonella choleraesuis*

Se introducen 25 g de muestra con 225 ml de agua de peptona tamponada estéril en una bolsa estéril y se homogeneiza durante 1 ó 2 minutos. Se preparan diluciones seriadas y se siembra 0,1 ml de las diluciones escogidas en superficie de agar SMID, distribuyéndolo por toda la placa de Petri con un asa de Drigalsky. Se incuban durante 24 horas a 37°C y pasado este período, se cuentan las colonias de color rosa y se realizan los cálculos necesarios para determinar el número de ufc/g de la muestra problema (Tabla 10).

Tabla 9. Determinación de *Salmonella* (Método ISO, 1993)

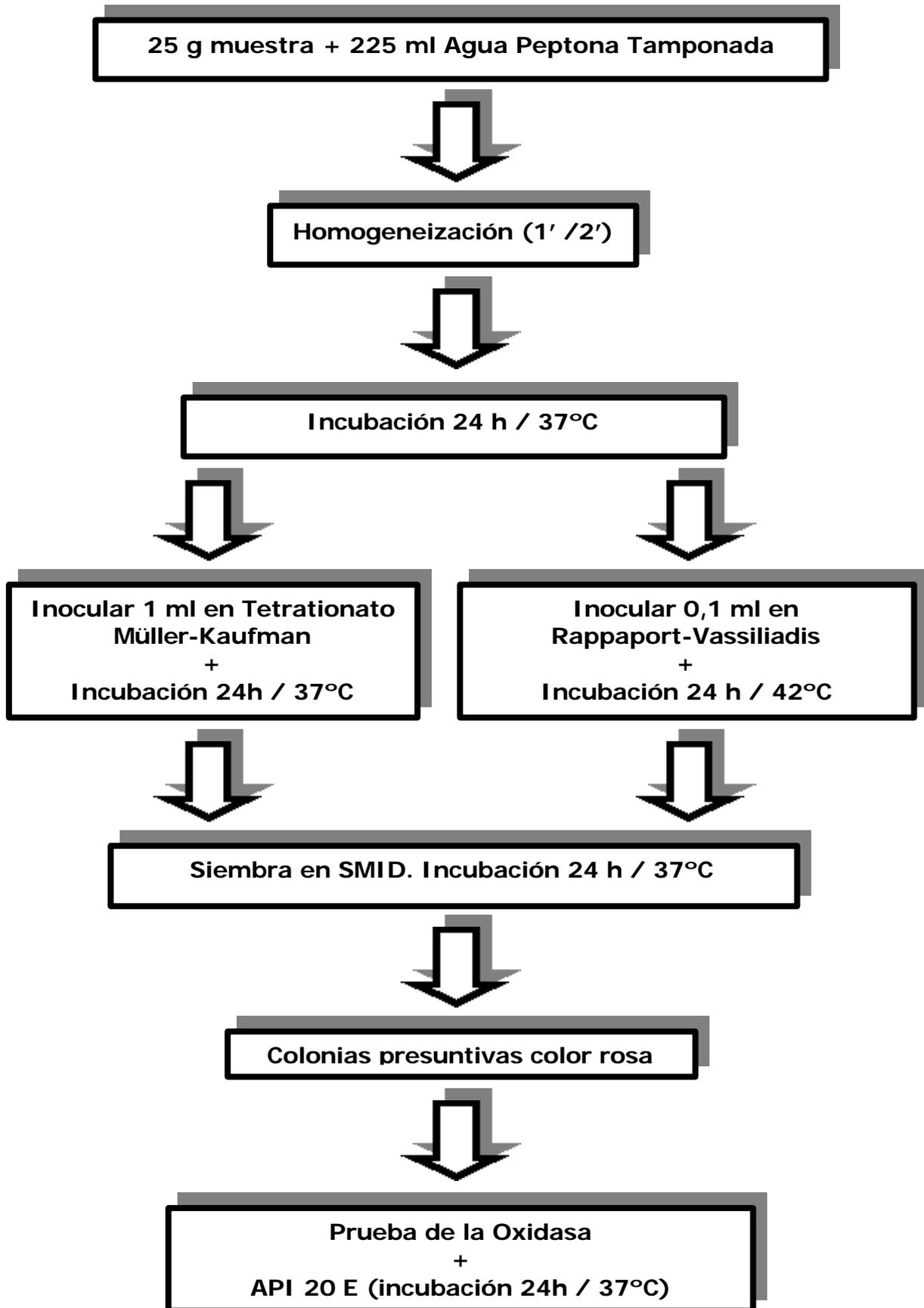
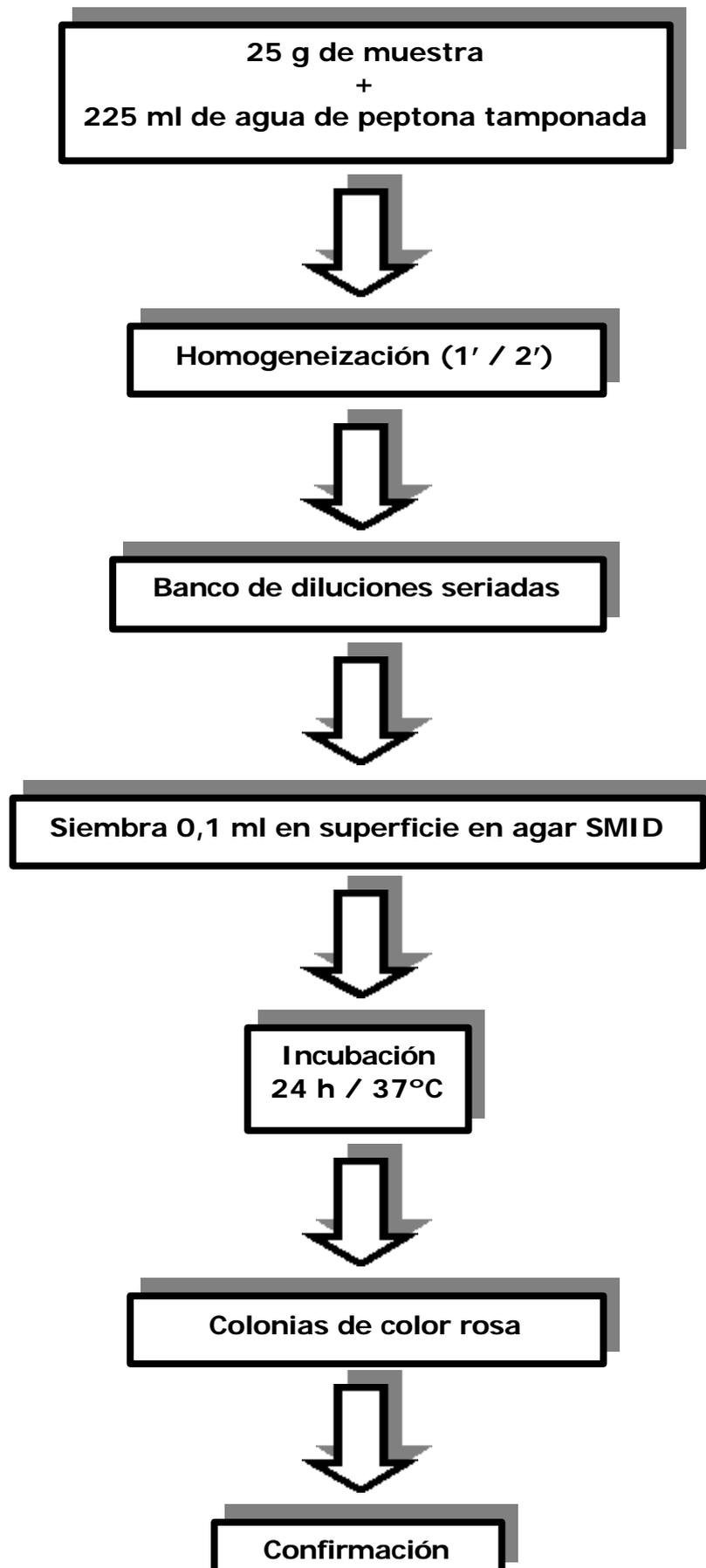


Tabla 10. Recuento de *Salmonella*



3.3 Recuento de microorganismos mesófilos totales a 30°C

Se utilizó el recuento en placa con el medio Plate Count Agar (PCA, Biokar Diagnostics).

Se sembró 1 ml de cada una de las diluciones por duplicado en masa en agar PCA y se incubó durante 48 a 72 horas a 30°C.

Los recuentos de las colonias de morfología típica, pequeñas y redondas de bordes lisos de color blanco marfil, se efectuaron sobre la totalidad de las colonias en aquellas placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, calculando la media de los recuentos obtenidos en las dos placas y multiplicando por el inverso de la dilución correspondiente. El resultado se expresa como ufc/g.

3.4 Recuento de los microorganismos de la flora láctica

Se utilizó el recuento en placa con el medio de cultivo MRS (Gelosa de Man, Rogosa y Sharpe, Biokar Diagnostics).

Se sembró 1 ml de cada una de las diluciones por duplicado en masa en agar MRS y se incubó durante 48 horas a 37°C.

Se realizó el recuento de las colonias de morfología típica, redondas de bordes lisos de color blanco marfil, y se procedió de la misma forma que se ha explicado en el apartado anterior.

3.5 Recuento de microorganismos del género *Micrococcus*

Se utilizó el método de recuento en placa con el medio de cultivo BP (Agar Baird-Parker base, Biolife) con yema de huevo (Egg Yolk Tellurite Emulsion, Biokar Diagnostic).

Se sembró 1 ml de cada una de las diluciones por duplicado en profundidad en agar BP con yema de huevo y se incubó durante 48 horas a 37°C.

Se realizó el recuento de las colonias de morfología típica, redondas de bordes lisos de color negro, y se procedió de la misma forma que se ha explicado en el apartado anterior.

3.6 Recuento de mohos y levaduras

Se utilizó el recuento en placa con el medio RB (Agar Rosa de Bengala, ADSA Micro) con cloranfenicol.

Se sembró 1 ml de cada una de las diluciones por duplicado en masa en agar RB con cloranfenicol y se incubó durante 5 días a 20°C.

Se realizó el recuento de las colonias de morfología típica de mohos, colonias filamentosas en superficie, y de levaduras, colonias pequeñas redondas de bordes lisos de color marfil, y se procedió de la misma forma que se ha explicado en el apartado anterior.

4. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para el estudio estadístico de los resultados utilizamos la distribución *t* de Student con nivel de significación de 0,05 y n-1 grados de libertad.

5. MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS

➤ **Caldo BHI** (Brain Heart Infusion Broth) de Scharlau Microbiology que tiene la composición, expresada en gramos por litro, siguiente:

- Extracto de cerebro: 7,8
- Extracto de corazón: 9,7
- Peptona proteosa: 10,0
- Dextrosa: 2,0
- Cloruro sódico: 5,0
- Fosfato disódico: 2,5

Para la reconstitución del medio se disuelven 37 g del polvo en un litro de agua destilada, calentándolo para mezclarlo bien. Se distribuye en recipientes y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se ajusta el pH a 7.1.

➤ **Listeria Fraser broth half concentration** (Biolife). Medio líquido para el enriquecimiento de listeria en productos alimentarios. Su composición, expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Peptona proteosa: 5,0
- Triptona: 5,0
- Extracto de levadura: 5,0
- Extracto de carne: 5,0
- Cloruro sódico: 20,0
- Anhídrido fosfato sódico bibásico: 9,5
- Fosfato potasio monobásico: 1,35
- Esculina: 1,0
- Cloruro de litio: 3,0
- Acriflavina: 0,0125
- Ácido nalidíxico: 0,010.

Para reconstituir el medio se suspenden 27.4 g de polvo en 500 ml de agua destilada. Se calienta hasta la ebullición para su completa disolución. Se esteriliza durante 15 minutos a 121°C. Después de dejar enfriar hasta temperatura ambiente se añade un vial de suplemento: citrato amónico férrico (code: 421540056). Después se distribuye en tubos estériles. El pH es de 7.2 +/- 0.1.

➤ **Agua de peptona tamponada** (Scharlau Microbiology). Diluyente utilizado para la homogeneización de muestras alimentarias, según las recomendaciones del CeNAN. Su composición, expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Peptona: 10,0
- Cloruro sódico: 5,0
- Fosfato disódico: 9,0
- Fosfato dipotásico: 1,5.

Para su reconstitución se disuelven 25.5 g del polvo deshidratado en un litro de agua destilada. Se distribuye en tubos a razón de 9 ml o bien en frascos a razón de 225 ml y se esteriliza en el autoclave durante 15 minutos a 121°C.

➤ **Caldo base de tetrathionato** (Müller Kaufman Medium) de Scharlau Microbiology. Medio líquido para el aislamiento selectivo y enriquecimiento de *Salmonella ssp.* Su composición, expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Bilis: 5,0
- Extracto de carne: 4,5
- Peptona: 9,0
- Cloruro sódico: 2,70
- Carbonato cálcico: 40,50
- Tiosulfato sódico: 50,0

Para su reconstitución se añaden 112 g de polvo en un litro de agua destilada y se calienta hasta la ebullición. Se deja enfriar hasta 40-45°C y se le añade 20 ml de solución yodo-yodurada, y se reparte en tubos estériles.

Solución de yodo-yodurada para el medio caldo base de tetrathionato (Müller Kaufman Medium). Su composición, expresada en gramos por 100 ml, es la siguiente:

- Yodo: 20,0
- Yoduro potásico: 25,0

Para su preparación se disuelve el yoduro potásico en una parte de agua y se añade el yodo. Se mezcla hasta la disolución completa. La solución se mantiene al abrigo de la luz.

➤ **Caldo Rappaport Vassiliadis** (Scharlau Microbiology). Medio líquido para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella spp.* a partir de muestras alimentarias y otros materiales. Su composición, expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Soja peptona: 4,5
- Cloruro sódico: 7,2
- Fosfato monopotásico: 1,260
- Fosfato dipotásico: 0,180
- Cloruro magnésico: 13,50
- Verde malaquita: 0,036

Para preparar el medio se suspenden 26.8 g del polvo en un litro de agua destilada y se calienta hasta disolverlo. Se distribuye en recipientes adecuados y se esteriliza en el autoclave durante 15 minutos a 121°C. El medio tendrá un pH de 5.2 aproximadamente.

- **UVM I** (Oxoid). Medio de enriquecimiento para *Listeria* que se obtiene al adicionar al Caldo Base Enriquecimiento Listeria UVM, el Suplemento de Enriquecimiento Primario Listeria.

La composición del Caldo Base UVM, expresada en gramos por 500 ml, es la siguiente:

- Proteosa peptona: 5,0
- Triptona: 5,0
- Polvo "Lab Lenmco": 5,0
- Extracto de levadura: 5,0
- Cloruro sódico: 20,0
- Fosfato disódico: 12,0
- Fosfato monopotásico: 1,35
- Esculina: 1,0

La composición del Suplemento de Enriquecimiento Primario Listeria, expresada en miligramos, es la siguiente:

- Ácido nalidíxico: 10,0
- Clorhidrato de cariflavina: 6,0.

Para reconstituir el medio se suspende 27,2 g de Caldo Base Enriquecimiento Listeria UVM en 500 ml de agua destilada y se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después, se deja enfriar hasta

45-50°C y se le añade el contenido de un vial de Suplemento de Enriquecimiento Primario Listeria, disuelto previamente en 2 ml de agua destilada estéril, obteniendo el medio de enriquecimiento UVM I.

➤ **Agar SMID** (Biomérieux). La composición expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Extracto de carne de buey: 3,0
- Bio-polytone: 6,0
- Extracto de levadura: 2,0
- Sales biliares: 4,0
- Verde brillante: 0,0003
- Rojo neutro: 0,025
- Tris: 0,65
- Galactopiranosido: 0,17
- Glucopiranosido: 0,025
- Glucuronato sódico: 12,0
- Sorbitol: 8,0
- Agar: 13,5

➤ **ALOA** (Biolife). La composición expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Peptona: 18,0
- Extracto de levadura: 8,0
- Triptona: 8,0
- Factores de crecimiento: 4,20
- Cloruro sódico: 5,0
- Fosfato sódico bibásico: 2,50
- Cloruro de litio: 10,0
- X- Glucosido: 0,05
- Agar: 15,0

Para su reconstitución se suspenden 35.35 g en 500 ml de agua destilada, se calienta hasta la ebullición y su disolución total. Se esteriliza durante 15 minutos a 121°C. Se deja enfriar hasta 48-50°C y se le añade el contenido del vial del Suplemento de enriquecimiento selectivo ALOA. Después de

mezclar vigorosamente se distribuye en placas de petri estériles. La apariencia ha de ser de homogeneidad turbia, y el pH de 7.2 +/- 0.2

Suplemento de enriquecimiento selectivo ALOA (Biolife). Su composición, expresada en miligramos, es la siguiente:

- Ácido nalidíxico: 0,010
- Ceftazidime: 0,010
- Cycloheximide: 0,050
- Polimixin B: 0,005

Se reconstituye con 5 ml de agua destilada estéril y se añade a la base precalentada de ALOA a 48-50°C.

➤ **Listeria Palcam Agar Base** (Biolife). Se obtiene al adicionar al Listeria Palcam Agar Base, el Suplemento Selectivo Listeria Palcam (Biolife).

La composición de Listeria Palcam Agar Base, expresada en gramos por 500 ml, es la siguiente:

- Peptocomplejo: 10,0
- Triptosa: 10,0
- Peptona bacteriológica: 3,0
- Fécula de maíz: 1,0
- Cloruro sódico: 5,0
- Glucosa: 0,5
- Manitol: 10,0
- Esculina: 0,8
- Citrato férrico amónico: 0,5
- Cloruro de litio: 15,0
- Rojo fenol: 0,08
- Agar Bios LL: 15,0

La composición del Suplemento Selectivo Listeria Palcam, expresada en mg es la siguiente:

- Polimixina: B 5,0
- Clorhidrato de acriflavina: 2,5

- Ceftazidima: 10,0

Para reconstituir el medio se suspende 35,4 g en 500 ml de agua destilada, se disuelve completamente y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos (pH 7,2 ± 0,1). Se deja enfriar hasta 50°C y se le añade en condiciones asépticas el contenido de un vial de Suplemento Selectivo Listeria Palcam que ha sido reconstituido con 5 ml de agua destilada estéril. Se mezcla bien y se distribuye en placas de petri.

➤ **Agar Sangre.** Se obtiene a partir de Columbia Agar Base (Biolife) añadiendo un 5% de sangre estéril desfibrinada de caballo (Oxoid). La composición, expresada en gramos por litro, del Columbia Agar Base es la siguiente:

- Peptocomplejo: 10,0
- Triptosa: 10,0
- Peptona bacteriológica: 3,0
- Fécula de maíz: 1,0
- Cloruro sódico: 5,0
- Agar Bios LL: 12,0.

Para reconstituir el medio se suspenden 41 g en un litro de agua destilada, se mezcla bien y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Se deja enfriar hasta los 45-50°C y se le añade la sangre estéril desfibrinada de caballo a razón de un 5% del volumen total preparado, se homogeneiza bien y se distribuye en placas de petri estériles.

➤ **TSA** (Tryptona Soja Agar) de Scharlau Microbiology. Medio sólido para el mantenimiento de cepas. La composición, expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Tryptona: 15,0
- Peptona de soja: 5,0
- Cloruro sódico: 5,0
- Agar: 15,0

Para reconstituir el medio se suspenden 40 g en un litro de agua destilada. Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos y se distribuye en placas de petri estériles.

➤ **Plate Count Agar** (PCA) de Biokar Diagnostics. Su composición, expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Triptona: 5,0
- Extracto autolítico de levadura: 2,5
- Glucosa: 1,0
- Agar bacteriológico: 12,0

Se suspenden 20.5 g del medio deshidratado en polvo en un litro de agua destilada. Se lleva hasta la ebullición lentamente y se mezcla hasta su disolución completa. Se dispensa en tubos o botellas y se esteriliza en el autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se ajusta el pH del medio a 7.0 +/- 0.2.

➤ **Agar MRS** (Gelosa de Man, Rogosa y Sharpe) de Biokar Diagnostics. Su composición, expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Polypeptona: 10,0
- Extracto de carne: 10,0
- Extracto de levadura: 5,0
- Glucosa :20
- Tween 80: 1,08
- Fosfato dipotásico: 2,0
- Acetato sódico: 5,0
- Citrato amónico: 2,0
- Sulfato magnésico: 0,2
- Sulfato manganésico: 0,05
- Agar bacteriológico: 15,0

Se suspenden 70.3 g de medio en polvo deshidratado en un litro de agua destilada. Se hace llegar a la ebullición lentamente y se dispensa en tubos o botellas. Se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.

➤ **Agar Baird-Parker base (BP)** de Biolife. Su composición, expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Peptozimatic: 10,0
- Extracto de carne: 5,0
- Extracto de levadura: 1,0
- Piruvato sódico: 10,0
- Glicina: 12,0
- Cloruro de litio: 5,0
- Agar Bios II: 15,0.

Para su preparación se suspenden 58 gr del medio deshidratado en 950 ml de agua destilada, se calienta hasta hervir y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Se deja enfriar hasta 50°C y se añade 50 ml de Emulsión Telurítica de Yema de Huevo (Egg Yolk Tellurite Emulsion) de Biokar Diagnostics precalentada a 50°C. Se homogeneiza y se sirve en placas de petri estériles.

➤ **Agar Rosa de Bengala (RB)** de ADSA Micro. Su composición, expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Dextrosa: 10,0
- Peptona: 5,0
- Fosfato potásico: 1,0
- Sulfato magnésico: 0,5
- Rosa de Bengala: 0,05
- Cloramfenicol: 0,5
- Agar: 15,0

Para preparar el agar se suspenden 32g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, se lleva hasta la ebullición. Se esteriliza en el autoclave durante 15 minutos a 121°C. No se debe sobrecalentar el medio de cultivo ya que la acidez del medio puede hidrolizar parcialmente el agar. El medio debe tener un pH de 7.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. RESULTADOS DE LAS PARTIDAS NÚMEROS 1, 2 Y 3

Las muestras de pechugas de pavo frescas utilizadas para la elaboración de pechugas de pavo curadas fueron previamente analizadas y no se detectó la presencia de *Listeria* ni *Salmonella*.

1.1 Resultados de *Listeria innocua*

Las concentraciones iniciales de *Listeria innocua* que se inocularon a la carne de pavo fueron en la partida n° 1 de $3,75 \times 10^8$ ufc/g, en la n° 2 de $3,96 \times 10^9$ ufc/g, y en la n° 3 de $8,27 \times 10^9$ ufc/g. La media de las tres partidas fue de $4,2 \times 10^9$ ufc/g (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados de la evolución de *Listeria innocua* desde la inoculación hasta el día 119 en las partidas n° 1, 2 y 3.

	Partida n° 1	Partida n° 2	Partida n° 3	Media
Inoculación	$3,75 \times 10^8$	$3,96 \times 10^9$	$8,27 \times 10^9$	$4,2 \times 10^9$
Día 1	$1,72 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,67 \times 10^5$
Día 21	$3,45 \times 10^4$	$7,4 \times 10^4$	$3,12 \times 10^4$	$4,65 \times 10^4$
Día 63	$1,81 \times 10^4$	$1,42 \times 10^4$	$1,17 \times 10^4$	$1,46 \times 10^4$
Día 119	$9,5 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	$6,28 \times 10^3$

A lo largo del estudio, hasta los once meses de vida comercial del producto, en las muestras que se mantuvieron a temperatura de refrigeración de 4°C (lotes 1 y 2) los recuentos de *Listeria innocua* se mantuvieron entre 10^2 ufc/g y 10^4 ufc/g. Por otra parte, en las muestras que se mantuvieron a temperatura de 20°C (lotes 3 y 4) se observó que la bacteria desaparece completamente de las muestras analizadas de las tres partidas.

Todos estos resultados se pueden ver en la Tabla 12 para la partida n° 1, en la 13 para la partida n° 2, en la 14 para la partida n° 3 y en la 15 para la media de las tres partidas.

Tabla 12. Resultados de la evolución de *Listeria innocua* durante la vida comercial del producto en los lotes 1, 2, 3 y 4 de la partida n° 1

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Día 147	$2,1 \times 10^3$	1×10^2	2×10^2	$1,2 \times 10^3$
Día 231	3×10^2	$5,5 \times 10^2$	5×10^1	ND
Día 315	$5,5 \times 10^2$	1×10^2	Ausencia	1×10^1
Día 434	4×10^2	2×10^2	Ausencia	Ausencia

(ND: No determinado)

Tabla 13. Resultados de la evolución de *Listeria innocua* durante la vida comercial del producto en los lotes 1, 2, 3 y 4 de la partida n° 2

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Día 147	7×10^2	6×10^2	$2,15 \times 10^3$	2×10^2
Día 231	$3,91 \times 10^4$	8×10^2	1×10^2	2×10^2
Día 315	1×10^4	$1,9 \times 10^4$	Ausencia	Ausencia
Día 434	$8,1 \times 10^2$	1×10^1	Ausencia	Ausencia

Tabla 14. Resultados de la evolución de *Listeria innocua* durante la vida comercial del producto en los lotes 1, 2, 3 y 4 de la partida n° 3

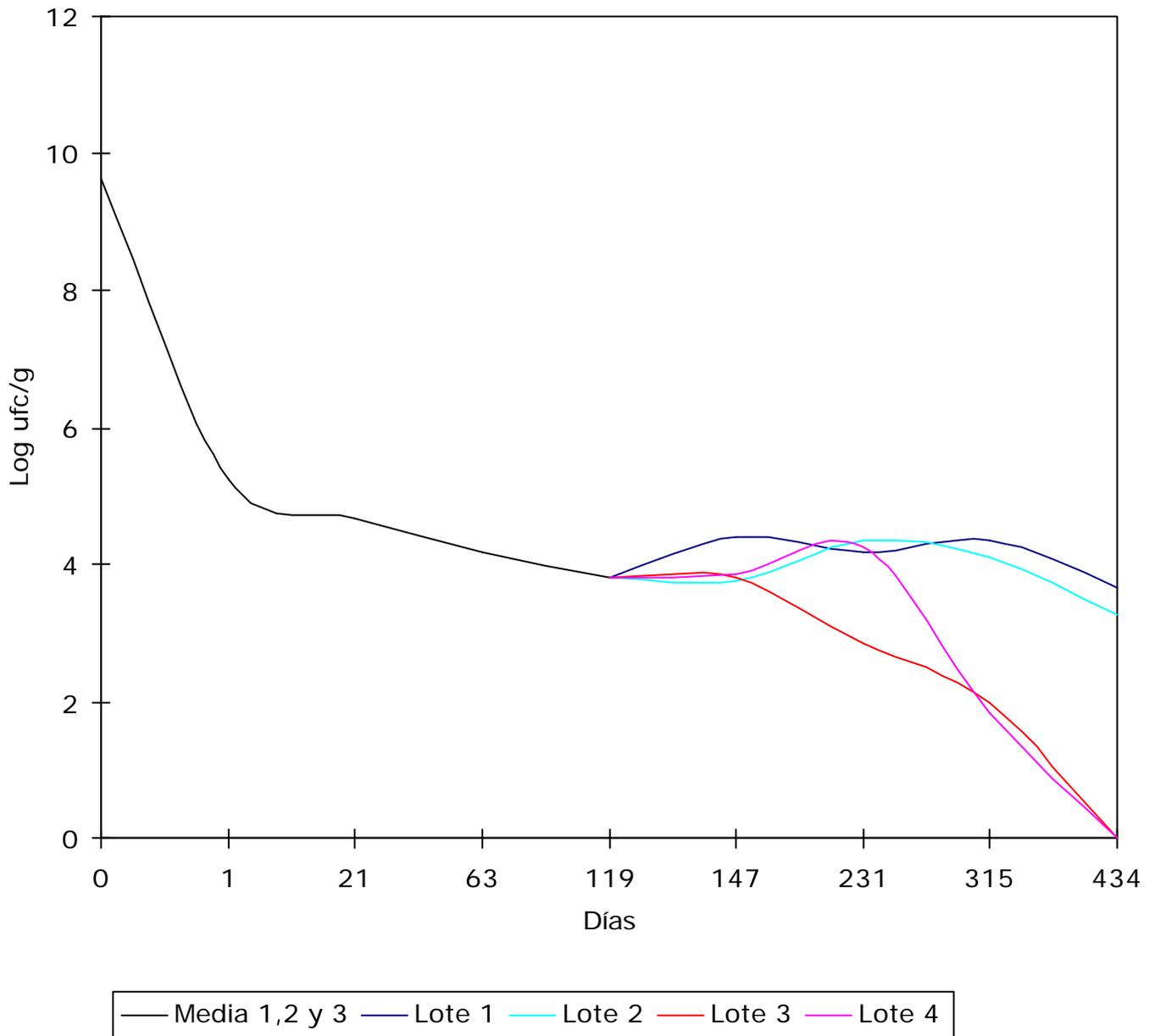
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Día 147	$7,27 \times 10^4$	$1,64 \times 10^4$	$1,68 \times 10^4$	2×10^4
Día 231	$2,14 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$	$1,95 \times 10^3$	$3,49 \times 10^4$
Día 315	$1,77 \times 10^3$	$1,86 \times 10^4$	3×10^2	2×10^2
Día 434	$1,3 \times 10^4$	$5,51 \times 10^3$	Ausencia	Ausencia

Tabla 15. Media de resultados de la evolución de *Listeria innocua* durante la vida comercial del producto en los lotes 1, 2, 3 y 4 de las partidas n° 1, 2 y 3

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Día 147	$2,51 \times 10^4$	$5,7 \times 10^3$	$6,38 \times 10^3$	$7,1 \times 10^3$
Día 231	$1,52 \times 10^4$	$2,21 \times 10^4$	7×10^2	1.75×10^4
Día 315	$2,2 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	1×10^2	7×10^1
Día 434	$4,73 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	Ausencia	Ausencia

Si sólo nos fijamos en la media de los resultados de las muestras de las tres partidas se observa que partimos de una concentración de *Listeria innocua* de $4,2 \times 10^9$ ufc/g (Tabla 11). En tan sólo 24 horas hay una reducción de 4 unidades logarítmicas en la concentración de la bacteria. A partir de este momento, y hasta que las muestras se dividen en cuatro lotes, sólo hay una reducción de 2 unidades logarítmicas en las concentraciones de *Listeria innocua*. A partir de este momento (Tablas 12-15), podemos observar que hay diferencia entre los lotes que se mantienen a temperaturas de refrigeración y los mantenidos a 20°C. Así, las concentraciones de *Listeria innocua* de los lotes mantenidos en refrigeración (lotes 1 y 2) tienen un comportamiento de estabilidad manteniéndose en concentraciones de 10^3 ufc/g; mientras que los lotes a 20°C (lotes 3 y 4) tienen una disminución constante de las concentraciones de *Listeria innocua* hasta desaparecer. Este comportamiento está representado gráficamente en la Figura 1.

Figura 1. Evolución de *Listeria innocua* en las partidas nº 1, 2 y 3



1.2 Resultados de *Salmonella choleraesuis*

Las concentraciones de *Salmonella choleraesuis* que se inocularon en la carne de pavo fueron inicialmente de 1×10^8 ufc/g en la partida n° 1, en la n° 2 de $4,69 \times 10^9$ ufc/g y en la n° 3 de $2,86 \times 10^9$ ufc/g (Tabla 16).

Tabla 16. Resultados de la evolución de *Salmonella choleraesuis* desde la inoculación hasta el día 119 en las partidas n° 1, 2 y 3

	Partida n° 1	Partida n° 2	Partida n° 3	Media
Inoculación	1×10^8	4.69×10^9	2.86×10^9	2.55×10^9
Día 1	4.6×10^3	2×10^4	ND	1.23×10^4
Día 21	ND	Ausencia	1×10^2	5×10^1
Día 63	$1,45 \times 10^3$	Ausencia	9.65×10^3	$3,7 \times 10^3$
Día 119	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

(ND: No determinado)

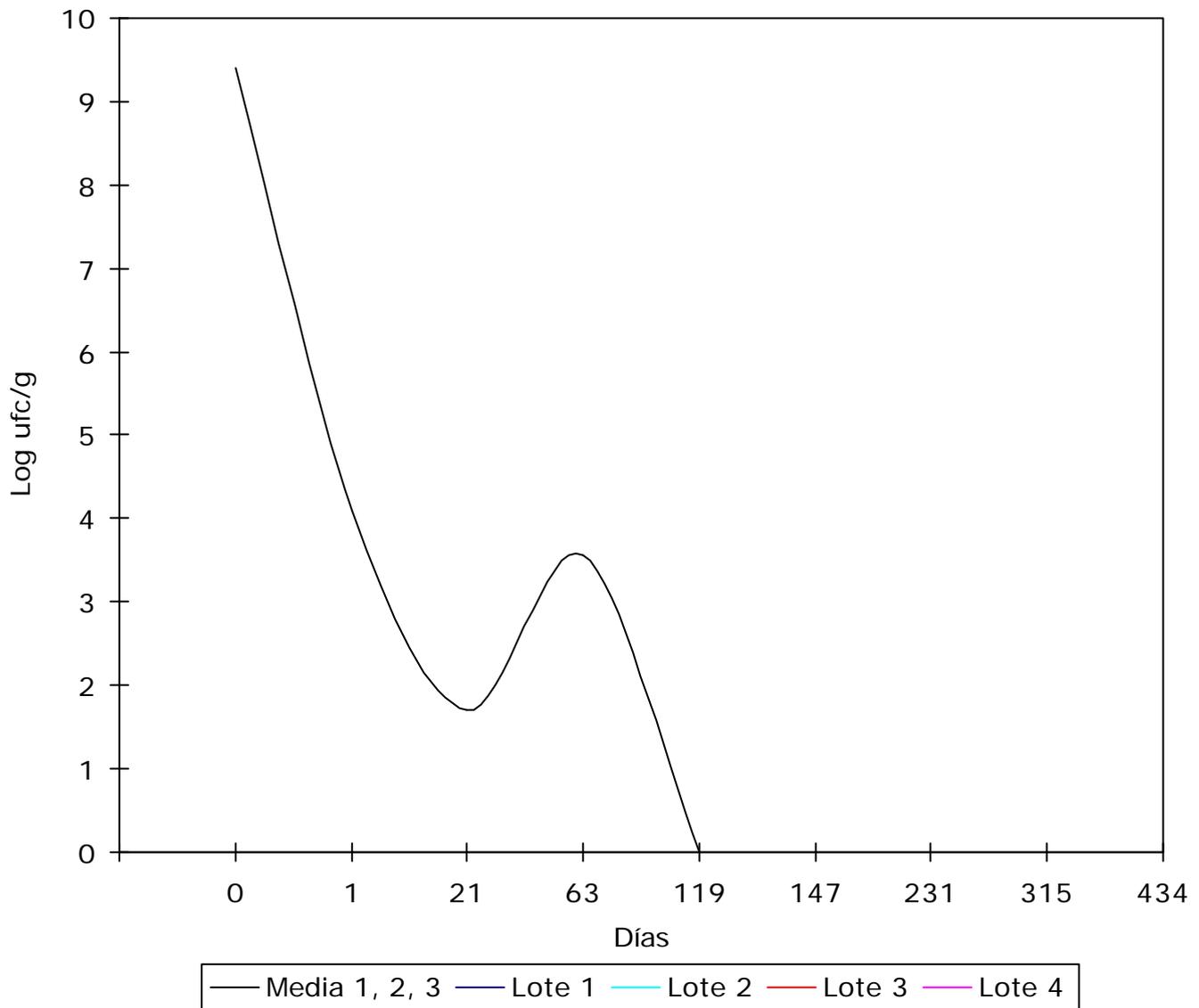
En estas partidas *Salmonella* desaparece a partir de las muestras tomadas el día 119, es decir, a partir del momento en el que se hacen las lonchas del producto y después de todo el proceso de maduración y secado. Todos estos resultados se pueden observar en la Tabla 17.

Tabla 17. Resultados de la evolución de *Salmonella choleraesuis* durante la vida comercial del producto en los lotes 1, 2, 3 y 4 de las partidas n° 1, 2 y 3

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Día 147	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Día 231	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Día 315	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Día 434	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

A las 24 horas de la inoculación experimental, cuando se realiza la mezcla de la carne de pavo con todos los ingredientes y las bacterias, después de mantenerse en refrigeración, la concentración de *Salmonella cholerasuis* disminuyó hasta 5 unidades logarítmicas (Tabla 16). A los 21 días del proceso, después de mantenerlo en refrigeración y en cierta anaerobiosis, encontramos otra disminución de hasta 3 unidades logarítmicas. Después de una breve recuperación en las concentraciones de hasta 2 unidades logarítmicas, las poblaciones de *Salmonella cholerasuis* desaparecen en los cuatro lotes. Estos resultados están representados gráficamente en la figura 2.

Figura 2. Evolución de *Salmonella choleraesuis* en las partidas nº 1, 2 y 3



1.3 Resultados del pH y de la actividad de agua

Los datos del pH y de la actividad de agua encontrados durante el estudio se muestran en las Tablas 18 y 19 representadas en las Figuras 3 y 4. El pH del producto aumentó de forma continua a lo largo del tiempo, pasando de un valor inicial de 5,74 hasta los valores finales de 6,17 y 6,39; mientras que la actividad de agua disminuyó desde un valor inicial de 0,962 hasta 0,871 y 0,838.

Tabla 18. Media de los resultados de la evolución de pH y a_w desde la inoculación hasta el día 119 de las partidas n° 1, 2 y 3

	pH	a_w
Inoculación	5,85	0,962
día 1	5,74	0,962
día 21	5,88	0,974
día 63	5,73	0,955
día 119	6,07	0,873

Tabla 19. Media de los resultados de la evolución de pH y a_w durante la vida comercial del producto de los lotes 1, 2, 3 y 4 de las partidas n° 1, 2 y 3

	pH lotes 1 y 2	pH lotes 3 y 4	a_w lotes 1y2	a_w lotes 3 y 4
día 147	6,25	6,24	0,863	0,866
día 231	6,12	6,26	0,868	0,861
día 315	6,19	6,28	0,854	0,851
día 434	6,17	6,39	0,871	0,838

Figura 3. Evolución del pH expresado como media de las partidas nº 1, 2 y 3

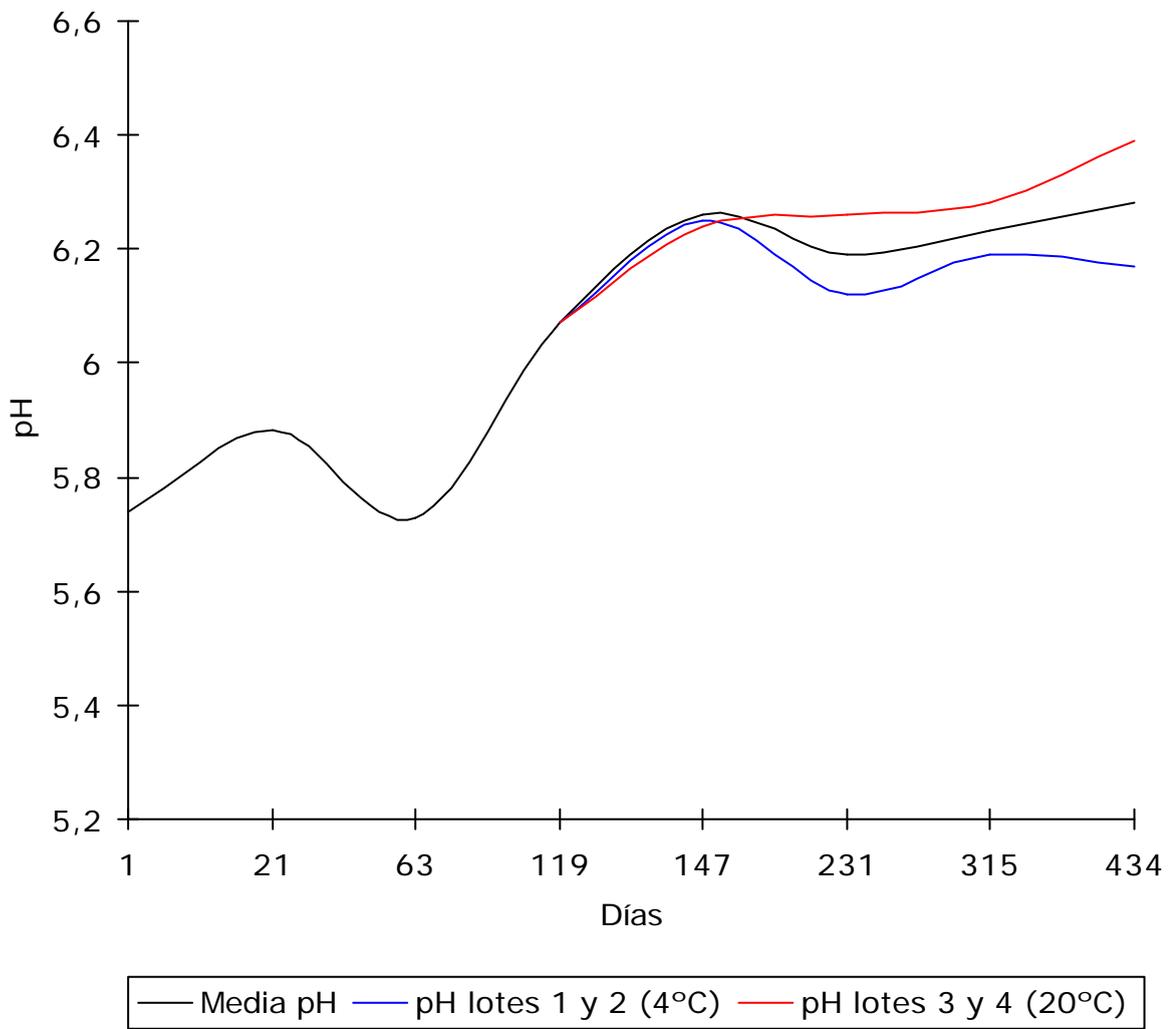
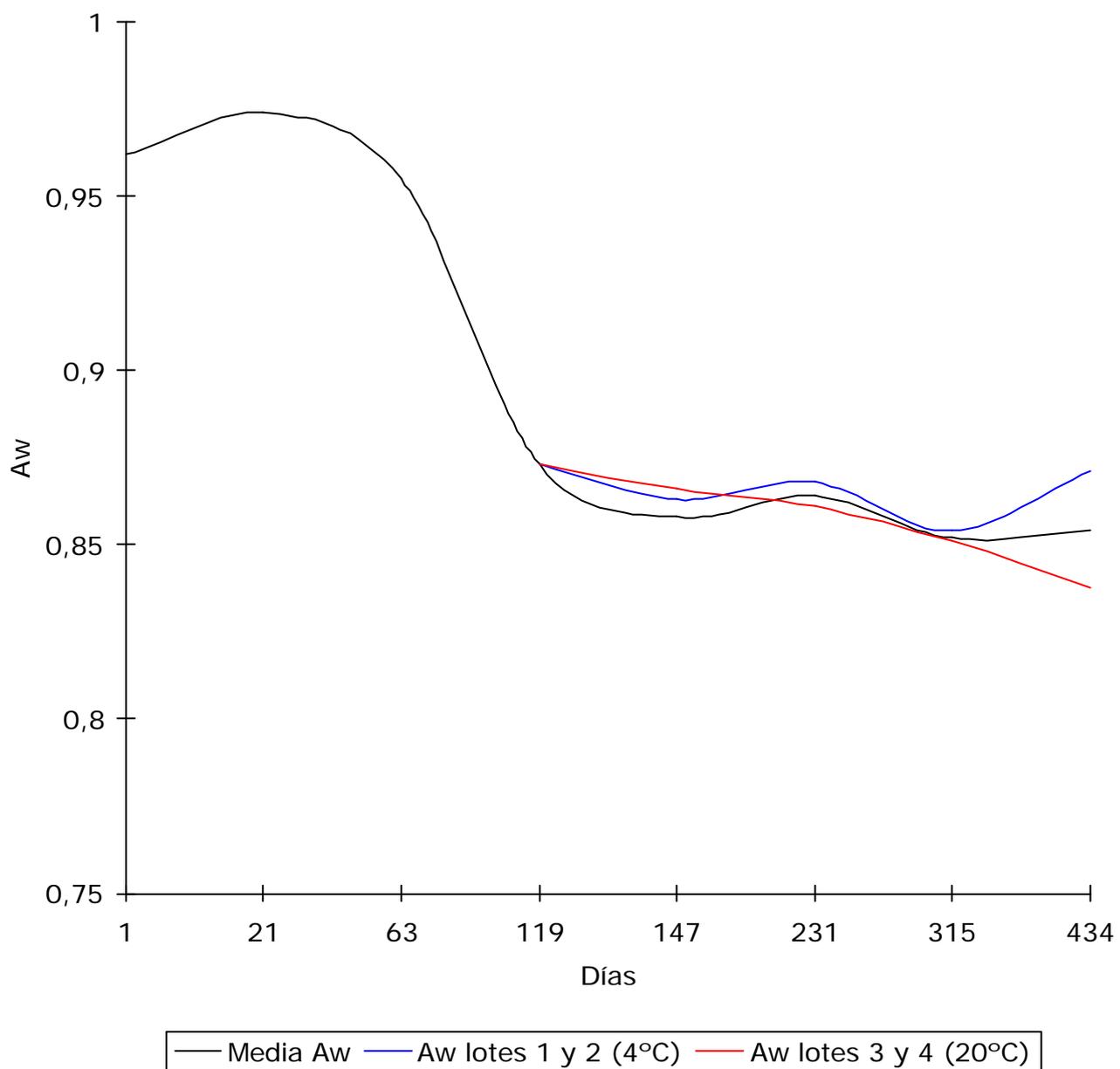


Figura 4. Evolución de la actividad de agua expresada como media de las partidas nº 1, 2 y 3



1.4 Discusión de los resultados de las partidas 1, 2 y 3

En la primera parte de nuestro estudio (hasta el día 21 del proceso) la disminución de la concentración de *Listeria innocua* en 4 unidades logarítmicas y de *Salmonella choleraesuis* en 5 unidades logarítmicas en tan sólo 24 horas, y de 1 y 3 unidades logarítmicas, respectivamente, en los 21 días siguientes, podría ser debida a los efectos de la temperatura, del pH, del vacío y de los ingredientes añadidos, que hicieron que la supervivencia de estas bacterias estuviera seriamente comprometida.

En el caso de *Listeria innocua*, la temperatura de 4°C no fue limitante para su crecimiento, resultado semejante al del estudio de Walker y col. (1990), en el que a 5°C *Listeria monocytogenes* podía crecer una unidad logarítmica en intervalos de tiempos de 1 a 3 días incrementándose este intervalo de tiempo cuando la temperatura era de 0°C. Así mismo, los tiempos de generación de esta bacteria eran menores cuando se mantenía a 5°C que a 0°C. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Golden y col. (1988), Olsen y col. (1988), Hof (1992), McLauchlin (1994) y ICMSF (1996).

El factor limitante en la supervivencia de *Listeria innocua* no es la temperatura sino la combinación de la temperatura con el pH. Así, según Palumbo y col. (1991) y Flanders y col. (1994), las bacterias del género *Listeria* no resisten las bajas temperaturas si el pH del medio es inferior a 4,74, ya que la recuperación de las células viables dañadas por el frío disminuye. En nuestro estudio el pH de la carne de pavo macerada durante 24 horas con los ingredientes, a temperatura de 4°C era de 5,74. Además, si la acidez del medio es debida a un ácido orgánico, como en nuestro estudio, en el que se adicionó ácido ascórbico como ingrediente, éste tiene una acción más inhibitoria del crecimiento microbiano que los ácidos inorgánicos debido a su acción lipofílica (Cole y col., 1990; Oh y Marshall, 1996; Blom y col., 1997).

La concentración de sal añadida al producto fue de un 2,47%, valor que favorece el crecimiento de las bacterias del género *Listeria* (Cole y col.,

1990). En su estudio, estos autores demuestran que la concentración óptima de sal para que crezca *Listeria spp* a temperaturas inferiores a 10°C es de un 2-2,5%. Estos datos se contradicen con el estudio de Tapia de Daza y col. (1991) que demuestran que las bajas actividades de agua que provoca la sal junto a temperaturas de 4°C tienen un elevado efecto bacteriostático.

Según Nolan y col. (1992), las actividades de agua mínimas en las que puede crecer *Listeria innocua* se encuentran entre 0,904 y 0,897. A las 24 horas del inicio del experimento la media de las actividades de agua que se registraron en todas las muestras analizadas fue de 0,962, a los 21 días fue de 0,974 y a partir del día 119, cuando el producto se divide en lonchas, los valores siempre fueron inferiores a 0,900.

El efecto del vacío sobre *Listeria innocua* durante los 21 primeros días del proceso no tuvo un efecto negativo en la pervivencia y crecimiento de la bacteria. En estudios realizados por Schmidt y Kaya (1991), se observaba que en los productos cárnicos envasados al vacío y almacenados a 4°C se incrementaba la población de *Listeria monocytogenes* de 2 a 4 unidades logarítmicas. Además, una de las principales características del género *Listeria* es la de tener un metabolismo anaerobio facultativo (ICMSF, 1996).

La adición de los conservantes alimentarios en la carne de pavo, tales como los nitratos y nitritos, no ayudan a disminuir la presencia de *Listeria spp* en los alimentos, tal como se demuestra en los estudios de Cox y col. (1989); Kerr y col. (1993) y McLauchlin (1994). Por el contrario, Farber (1989) y Line y Harrison (1992) indican que los conservantes añadidos en los productos cárnicos curados inhiben el crecimiento y la supervivencia de *Listeria spp*.

En el caso de *Salmonella cholerasuis*, los 21 días que el producto y la bacteria pasan a temperaturas de refrigeración son suficientes para que haya una reducción drástica de hasta 8 unidades logarítmicas. En este caso, el principal factor limitante para el crecimiento y la supervivencia de

Salmonella choleraesuis fue la temperatura. Así mismo, la actividad de agua del medio también fue un factor limitante importante.

Según D'Aoust (1994), la capacidad de crecimiento de *Salmonella* spp se reduce sustancialmente si la temperatura es inferior a 15°C, mientras que su crecimiento se previene si las temperaturas son inferiores a 7°C.

El límite de actividad de agua a partir del cual *Salmonella* spp ve comprometida su supervivencia y crecimiento es de 0,945 (ICMSF, 1996). En nuestro estudio, al final de los primeros 21 días ésta era de 0,974, y a partir del día 119 ya no superó nunca el valor 0,873.

Así mismo, según ICMSF (1996), el crecimiento de *Salmonella* spp se ve inhibido por la presencia de concentraciones de sal del 3-4%, ya que hacen disminuir la actividad de agua. Nuestro producto contenía un 2,47% de sal.

La capacidad del pH del medio para impedir la supervivencia de *Salmonella choleraesuis* no es determinante ya que la acidificación del medio mediante ácidos orgánicos no tiene un efecto bacteriostático contra *Salmonella* spp si el pH no es inferior a 5 (ICMSF, 1996). En nuestro caso el pH a las 24 horas era de 5,74, a los 21 días era de 5,88 y al final del estudio llegó hasta 6,28.

El vacío no tuvo un efecto negativo en la supervivencia y crecimiento de *Salmonella choleraesuis* durante los 21 primeros días del proceso, probablemente porque su metabolismo es anaerobio facultativo (ICMSF, 1996).

En la segunda parte del estudio (desde el día 21 hasta el 119) el producto estuvo sometido, en el secadero artificial, a condiciones ambientales con temperaturas de 8°C a 12°C y humedad ambiental de 55% a 75%. Durante este periodo el producto sufrió una importante pérdida de agua, tal y como demuestran los valores de la actividad de agua que pasan de 0,974 el día 21 a 0,873 el día 119, y un aumento de pH del producto pasando de valores de 5,88 el día 21 a 6,07 el día 119. Este período nos demuestra que la actividad de agua del producto era el principal factor limitante para el

crecimiento y la supervivencia tanto para *Listeria innocua* como para *Salmonella choleraesuis*.

En el caso de *Salmonella choleraesuis*, durante este periodo observamos una recuperación de sus concentraciones de hasta 2 unidades logarítmicas. Esto posiblemente fue debido a que los factores que más influencia tienen en su supervivencia tenían valores aptos para su crecimiento. Así pues, durante el proceso de secado había un aumento de las temperaturas, con valores superiores a 7°C, un mantenimiento de valores de pH superiores a 5 y una actividad de agua superior a 0,945. Pero al final de este período, el valor de 0,873 en la actividad de agua del producto provocó que desapareciera esta bacteria y, a partir de ese momento, *Salmonella choleraesuis* desapareció completamente de todas las muestras de todas las partidas analizadas hasta finalizar el estudio, independientemente de los tratamientos posteriores que aplicamos al producto.

En la última parte del estudio (desde el momento en que se hacen lonchas y se dividen las partidas en lotes hasta finalizar el estudio) los resultados los podemos agrupar en función de la temperatura de cada lote independientemente del tratamiento a que fueron sometidos.

Durante la parte final del estudio las concentraciones de *Listeria innocua* en los lotes 1 y 2 aumentaron hasta alcanzar concentraciones de 10^4 ufc/g para finalizar con concentraciones de 10^3 ufc/g. Esta supervivencia podría explicarse por el mantenimiento del pH en valores superiores a 6,19 en temperaturas de refrigeración. Estos resultados coinciden con el estudio de Cole y col. (1990), en el que el valor mínimo de pH, a temperaturas de 5°C en que las bacterias del género *Listeria* podían sobrevivir, era de 4,19.

Las concentraciones de *Listeria innocua* en los lotes 3 y 4 disminuyen progresivamente hasta alcanzar valores de 10^2 ufc/g y 10^1 ufc/g, en las muestras con 7 meses de vida comercial, para desaparecer completamente en las últimas muestras del estudio, a los once meses. Esta disminución y desaparición total de *Listeria innocua* podría ser debida al efecto combinado de temperaturas superiores a las de refrigeración pero inferiores a las

óptimas de crecimiento, junto con la fuerte disminución de las actividades de agua del producto, alcanzando un valor final de 0,838, inferior al límite mínimo de 0,897 descrito por Nolan y col. (1992). Durante este periodo, los valores de pH se mantuvieron superiores a 6,24 siempre dentro del intervalo óptimo definido por ICMSF (1996).

Finalmente, la comparación de las concentraciones de *Listeria innocua* de los lotes tratados con altas presiones y los no tratados no mostró diferencias significativas. Solamente puede destacarse que los lotes 2 y 4, los tratados con altas presiones, presentaron una disminución en las concentraciones de *Listeria innocua* después del tratamiento; sin embargo, se recuperaron a lo largo del tiempo alcanzando valores similares al final del estudio a los de los lotes sin tratar. Este hecho podría ser debido a que las bacterias Gram positivas son más resistentes a los tratamientos con altas presiones (Simpson y Gilmour, 1997a, 1997b; Kalchayanand y col., 1998a, 1998b), y al tipo de alimento, un producto cárnico curado, que podría tener influencia en la eficacia de este tratamiento.

2. RESULTADOS DE LA PARTIDA NÚMERO 4

2.1 Resultados del lote 1

Después de comprobar que el producto utilizado para el estudio no contenía *Listeria spp* se inoculó con *Listeria innocua* el jamón de pavo curado en lonchas obteniendo una concentración inicial de 1×10^5 ufc/g. Se obtuvo una disminución de entre 1 a 1,5 unidades logarítmicas en la concentración de *Listeria innocua* desde el momento de su inoculación hasta el último análisis realizado (Tabla 20, Figura 5).

El producto contenía una concentración inicial de bacterias de la flora láctica de 1×10^4 ufc/g, que aumentó hasta $1,95 \times 10^6$ ufc/g después de la inoculación experimental con *Listeria innocua*, y se mantuvo en concentraciones de 10^6 ufc/g hasta al final del estudio. En cuanto a las bacterias del género *Micrococcus*, su concentración inicial fue de 3×10^5

ufc/g aumentando a lo largo del tiempo hasta concentraciones de $2,88 \times 10^6$ ufc/g en la última muestra. Los microorganismos mesófilos totales a 30°C tuvieron una concentración inicial de $2,84 \times 10^6$ ufc/g y una final de $3,59 \times 10^6$ ufc/g, manteniéndose a lo largo del experimento dentro de estas concentraciones. La concentración inicial de los mohos fue de 8×10^3 ufc/g, y fluctuó entre 10^3 ufc/g y 10^5 ufc/g. La concentración de las levaduras fue $3,23 \times 10^5$ ufc/g y varió entre de 10^4 ufc/g y 10^6 ufc/g.

2.2 Resultados del lote 2

La concentración inicial de 1×10^5 ufc/g de *Listeria innocua* disminuyó paulatinamente hasta alcanzar $4,95 \times 10^3$ ufc/g, reduciéndose la concentración aproximadamente en dos unidades logarítmicas (Tabla 21, Figura 6). Las bacterias de la flora láctica se mantuvieron en concentraciones de 10^5 ufc/g y 10^6 ufc/g, los microorganismos del género *Micrococcus* incrementaron su concentración hasta $1,55 \times 10^6$ ufc/g, y los microorganismos mesófilos totales a 30°C evolucionaron de forma fluctuante manteniéndose en concentraciones comprendidas entre 10^5 ufc/g y 10^7 ufc/g. Los mohos y las levaduras tuvieron un comportamiento oscilante con importantes variaciones en sus concentraciones de entre 1 a 3 unidades logarítmicas.

2.3 Resultados del lote 3

La concentración inicial de *Listeria innocua* era de 1×10^5 ufc/g; ésta disminuyó de forma progresiva hasta 10^1 ufc/g, en los días 75 y 90, y posteriormente se recuperó lentamente hasta 10^2 ufc/g en la última muestra analizada (Tabla 22, Figura 7). La concentración inicial de las bacterias de la flora láctica era de 1×10^4 ufc/g, la cual fue aumentando de forma constante hasta la concentración final de $3,36 \times 10^8$ ufc/g. En el caso de las bacterias del género *Micrococcus*, se partió inicialmente de una concentración de 3×10^5 ufc/g que aumentó constantemente hasta la concentración final de $4,95 \times 10^7$ ufc/g. La misma evolución siguieron las bacterias mesófilas totales a 30°C que inicialmente era $2,84 \times 10^6$ ufc/g y al final fue $4,04 \times 10^7$ ufc/g. Por lo que se refiere a los mohos, se partió de una

concentración de 8×10^3 ufc/g, se alcanzó una concentración máxima el día 60 con $5,5 \times 10^4$ ufc/g, y a partir de entonces disminuyó paulatinamente hasta alcanzar $3,65 \times 10^2$ ufc/g. El comportamiento de las levaduras fue idéntico al de los mohos, partiendo de $3,23 \times 10^5$ ufc/g se alcanzó la concentración máxima el día 45 con $1,54 \times 10^6$ ufc/g, y se finalizó con 4×10^4 ufc/g.

2.4 Resultados del lote 4

La concentración inicial de *Listeria innocua* fue de 1×10^5 ufc/g, a los 75 días se alcanzó la concentración mínima de 2×10^1 ufc/g, y al final del estudio aumentó hasta $1,88 \times 10^3$ ufc/g (Tabla 23, Figura 8). La evolución de las bacterias de la flora láctica fue siempre ascendente, partiendo inicialmente de una concentración de 1×10^4 ufc/g se llegó hasta $1,81 \times 10^9$ ufc/g. En el caso de las bacterias del género *Micrococcus*, se partió de 3×10^5 ufc/g y su concentración estuvo variando entre 10^6 ufc/g y 10^7 ufc/g durante todo el estudio para finalizar con $6,8 \times 10^6$ ufc/g. Los microorganismos mesófilos totales a 30°C sufrieron una evolución similar a las bacterias de la flora láctica, partiendo de $2,84 \times 10^6$ ufc/g se alcanzó al final $1,25 \times 10^8$ ufc/g. Los mohos evolucionaron con una disminución de sus concentraciones, partiendo de 8×10^3 ufc/g disminuyeron hasta $1,05 \times 10^2$ ufc/g. Las levaduras disminuyeron con altibajos su concentración desde $3,23 \times 10^5$ ufc/g hasta $1,6 \times 10^3$ ufc/g.

Tabla 20. Evolución de los microorganismos en las muestras del lote 1 de la partida 4

	<i>Listeria</i>	Flora láctica	<i>Micrococcus</i>	Mesófilos totales a 30°C	Mohos	Levaduras
Día 1	1×10^5	1.95×10^6	2.76×10^5	2.43×10^6	9×10^3	3.41×10^5
Día 30	2.35×10^4	1.87×10^6	5.26×10^5	2.58×10^6	3×10^3	ND
Día 45	2.35×10^4	3.33×10^6	1.14×10^6	4×10^6	6.85×10^4	1.7×10^6
Día 60	4.1×10^4	1.12×10^6	7.6×10^5	2.4×10^6	2.9×10^4	1.24×10^5
Día 75	2.1×10^4	1.72×10^6	9.85×10^5	2.75×10^6	1.06×10^5	1.85×10^5
Día 90	2.4×10^4	5×10^5	6.15×10^5	$1,32 \times 10^6$	2.7×10^4	1.11×10^6
Día 120	9.35×10^3	1.83×10^6	1.52×10^6	3.85×10^6	1.05×10^5	2.42×10^6
Día 135	1.73×10^4	1.93×10^6	1.27×10^6	2.96×10^6	2.2×10^4	3.79×10^5
Día 150	3.33×10^4	1.95×10^6	9.5×10^5	4.16×10^6	6.45×10^4	1.32×10^6
Día 180	1.04×10^4	1.36×10^6	1.9×10^6	1.81×10^6	6×10^3	3.1×10^4
Día 210	7.4×10^3	2.14×10^6	2.88×10^6	3.59×10^6	6.2×10^4	8.55×10^6

(ND: no determinado).

Tabla nº 21. Evolución de los microorganismos en las muestras del lote 2 de la partida 4

	<i>Listeria</i>	Flora láctica	<i>Micrococcus</i>	Mesófilos totales a 30°C	Mohos	Levaduras
Día 1	1×10^5	1.95×10^6	2.76×10^5	2.43×10^6	9×10^3	3.41×10^5
Día 30	2.95×10^4	5.65×10^5	6.1×10^4	2.43×10^6	1.1×10^4	ND
Día 45	1.4×10^4	1.1×10^6	5×10^4	1.17×10^6	1×10^3	ND
Día 60	9×10^3	6.45×10^5	5.04×10^5	8.83×10^5	2.7×10^2	1.06×10^3
Día 75	1.24×10^4	1.72×10^6	1.41×10^6	2.64×10^6	6×10^1	1.6×10^2
Día 90	6.6×10^3	1.15×10^6	2.4×10^6	3×10^6	3×10^2	8.4×10^3
Día 120	6.05×10^3	1.06×10^6	3.2×10^6	4.46×10^6	4.2×10^2	8.63×10^3
Día 135	1.95×10^3	2.43×10^6	4.4×10^6	7.82×10^6	3.06×10^2	8.75×10^3
Día 150	2.7×10^3	2.26×10^5	6.8×10^6	2.32×10^7	1.1×10^3	1.34×10^4
Día 180	3×10^3	2.7×10^6	5.3×10^6	7.53×10^6	2×10^2	9.05×10^3
Día 210	4.95×10^3	6.06×10^5	1.55×10^6	5.75×10^6	2.4×10^2	8.1×10^3

(ND: no determinado).

Tabla 22. Evolución de los microorganismos en las muestras del lote 3 de la partida 4

	<i>Listeria</i>	Flora láctica	Micrococ- <i>cus</i>	Mesófilos totales a 30°C	Mohos	Levaduras
Día 1	1×10^5	1.95×10^6	2.76×10^5	2.43×10^6	9×10^3	3.41×10^5
Día 30	3.3×10^4	6.92×10^7	7.18×10^6	1.77×10^7	6×10^3	3.2×10^4
Día 45	7.5×10^3	1×10^8	1.4×10^7	4.83×10^7	4.35×10^4	1.54×10^6
Día 60	6×10^3	4.45×10^7	1.59×10^7	4×10^7	5.5×10^4	1.38×10^5
Día 75	5.5×10^1	3.93×10^7	8.72×10^6	2.12×10^7	1×10^4	1.04×10^5
Día 90	3×10^1	2.69×10^7	1.42×10^7	2×10^7	2.5×10^3	1.6×10^5
Día 120	5.85×10^2	7.7×10^7	1.75×10^7	2.77×10^7	7.5×10^3	7.26×10^4
Día 135	$9,9 \times 10^2$	2.3×10^8	2.43×10^7	4.08×10^7	1.43×10^3	1.01×10^4
Día 150	6.3×10^2	1.97×10^8	3.5×10^7	5.66×10^7	2.2×10^3	3.7×10^4
Día 180	3.85×10^2	4.25×10^7	1.9×10^7	1.5×10^7	1×10^2	1.3×10^4
Día 210	3.15×10^2	3.36×10^8	4.95×10^7	4.04×10^7	3.65×10^2	4×10^4

Tabla 23. Evolución de los microorganismos en las muestras del lote 4 de la partida 4

	<i>Listeria</i>	Flora láctica	Micrococ- <i>Cus</i>	Mesófilos totales a 30°C	Mohos	Levaduras
Día 1	1×10^5	1.95×10^6	2.76×10^5	2.43×10^6	9×10^3	3.41×10^5
Día 30	8×10^3	7.72×10^7	3.04×10^6	3.65×10^7	3×10^3	8.6×10^3
Día 45	1×10^3	1.67×10^8	1.17×10^7	9.79×10^7	1.1×10^4	2×10^3
Día 60	2×10^2	1.58×10^8	5.65×10^6	2.8×10^7	2.05×10^3	3×10^2
Día 75	2×10^1	1.50×10^8	1.53×10^7	1.94×10^7	3.2×10^2	5.1×10^2
Día 90	8×10^1	1.63×10^7	5.85×10^6	1×10^6	2.85×10^2	5.6×10^3
Día 120	4.4×10^2	1.96×10^8	2×10^7	1.27×10^8	6.3×10^2	1.05×10^4
Día 135	6.5×10^2	6.14×10^8	1.59×10^7	2.88×10^8	1.7×10^2	3.2×10^3
Día 150	5.2×10^2	5.38×10^8	3.83×10^7	4.02×10^8	8×10^1	1.65×10^3
Día 180	3.34×10^3	2.43×10^8	3.1×10^7	3×10^7	2.25×10^2	2.7×10^2
Día 210	1.88×10^3	1.81×10^9	6.8×10^6	1.25×10^8	1.05×10^2	1.6×10^3

Figura 5. Evolución de los microorganismos en el lote 1 de la partida 4

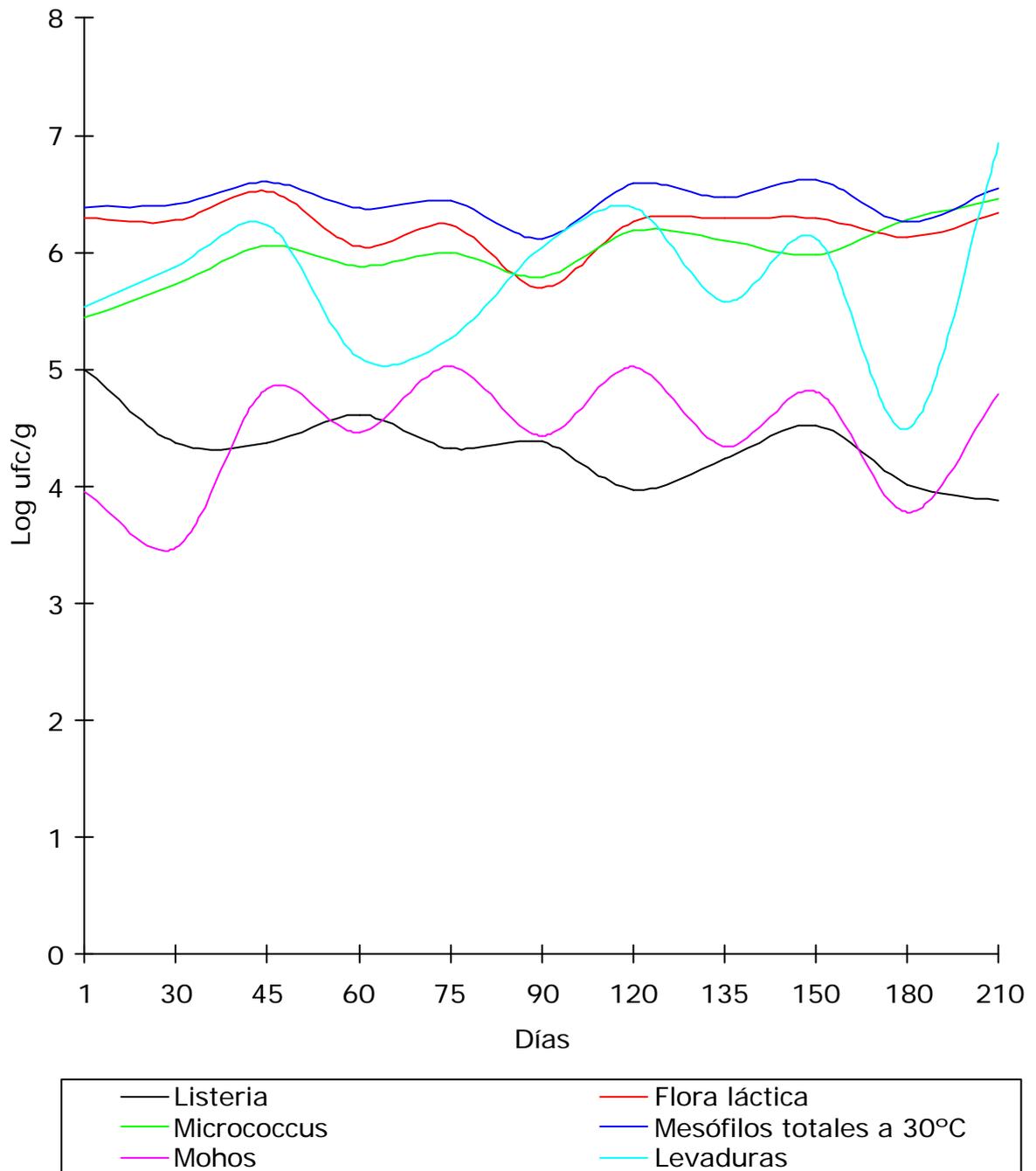


Figura 6. Evolución de los microorganismos en el lote 2 de la partida 4

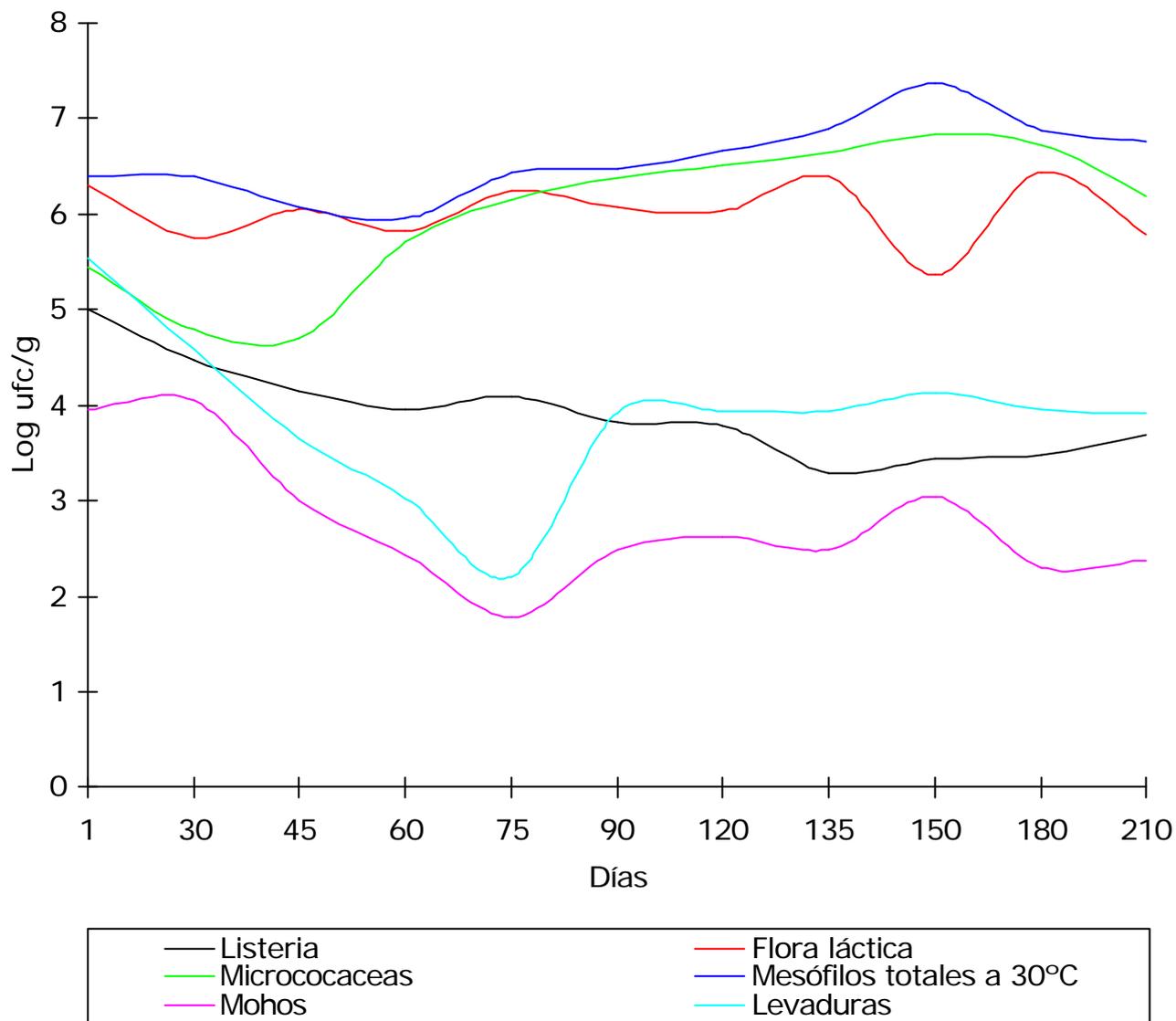


Figura 7. Evolución de los microorganismos en el lote 3 de la partida 4

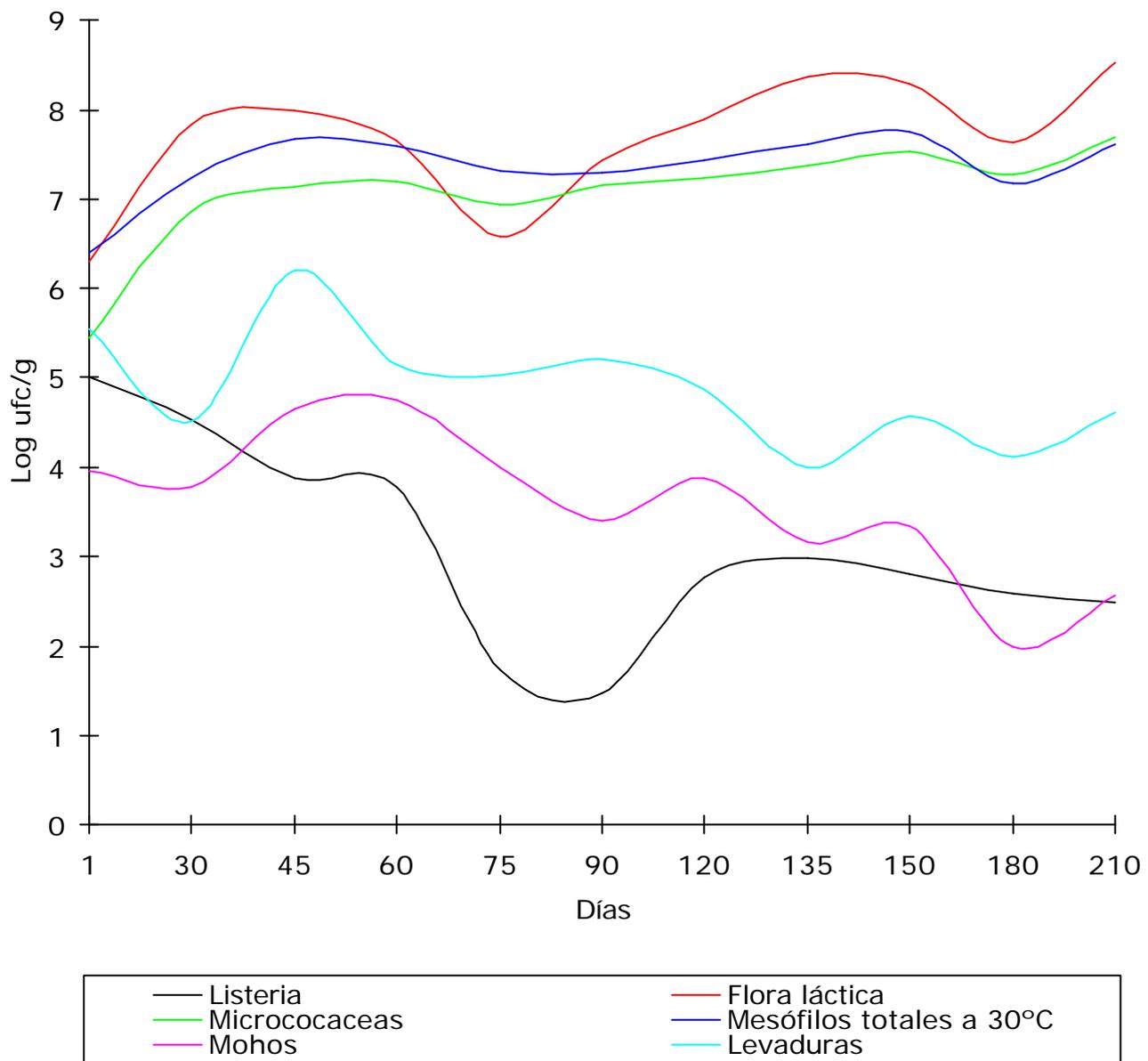
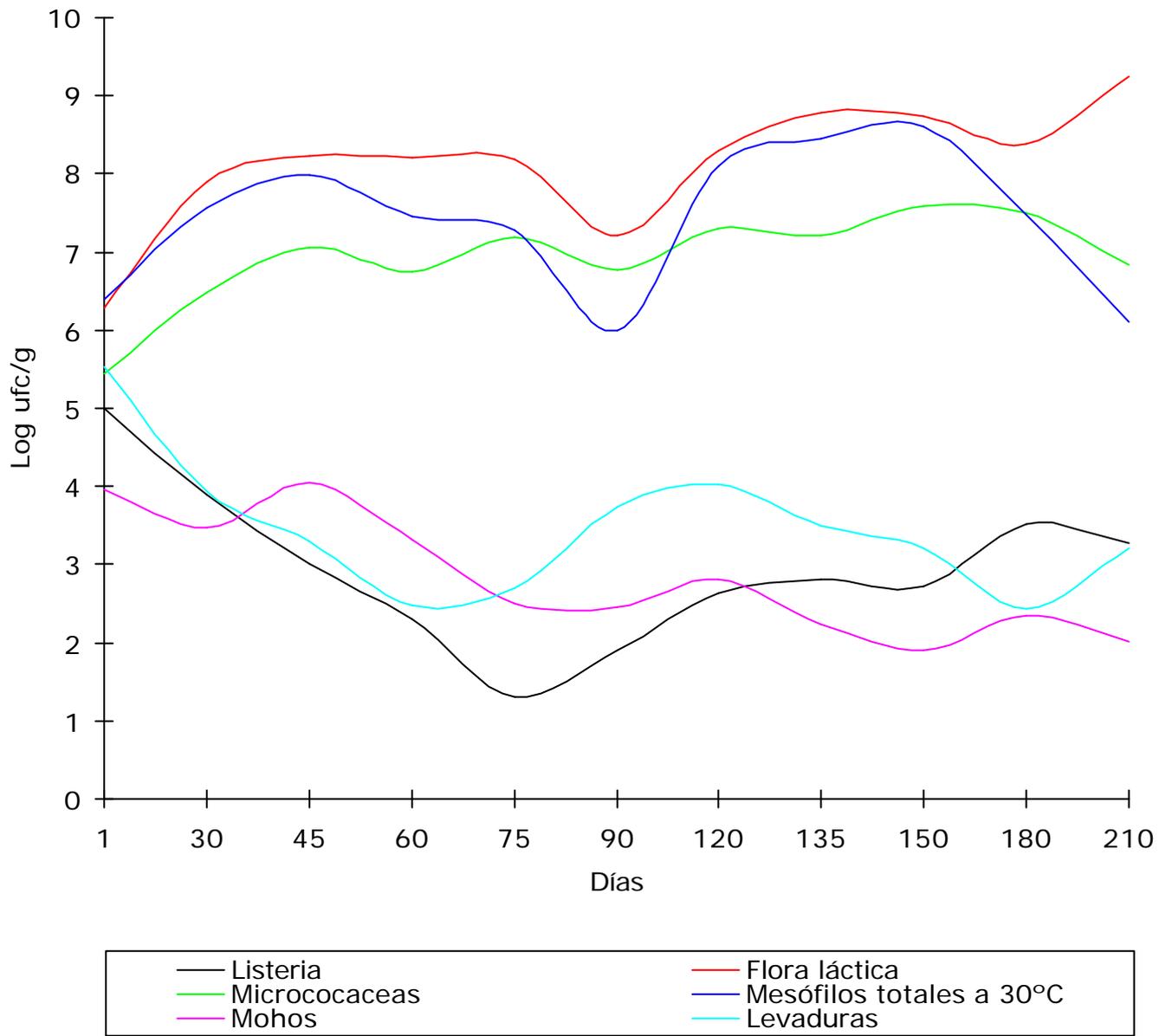


Figura 8. Evolución de los microorganismos en el lote 4 de la partida 4



2.5 Resultados del pH y de la actividad de agua

El pH de los lotes 1 y 2 disminuyó lentamente a lo largo del estudio desde 6,25 el día 1 hasta 6,15 el día 210 (Tabla 24, Figura 9). Al contrario ocurre con los valores de los lote 3 y 4, que aumentan lentamente desde 6,24 el día 1 hasta 6,30 el día 210.

Los resultados de la actividad de agua de las muestras del lote 1 y 2 reflejan un aumento lento de estos valores, desde 0,863 el día 1 hasta 0,867 el día 210 (Tabla 25, Figura 10). Los resultados en los lotes 3 y 4 se comportan de forma contraria, disminuyendo progresivamente desde 0,866 el día 1 hasta 0,852 el día 210.

Tabla 24. Evolución del pH de la partida 4

	Día 1	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75	Día 90	Día 120	Día 135	Día 150	Día 180	Día 210
Lotes 1 y 2	6,25	6,23	6,24	6,22	6,19	6,17	6,14	6,12	6,12	6,13	6,15
Lotes 3 y 4	6,24	6,24	6,25	6,23	6,27	6,25	6,24	6,24	6,25	6,27	6,3

Tabla 25. Evolución de la actividad de agua de la partida 4

	Día 1	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75	Día 90	Día 120	Día 135	Día 150	Día 180	Día 210
Lotes 1 y 2	0,863	0,866	0,865	0,867	0,865	0,866	0,868	0,867	0,869	0,866	0,867
Lotes 3 y 4	0,866	0,864	0,865	0,867	0,864	0,865	0,867	0,86	0,857	0,855	0,852

Figura 9. Evolución del pH de la partida 4

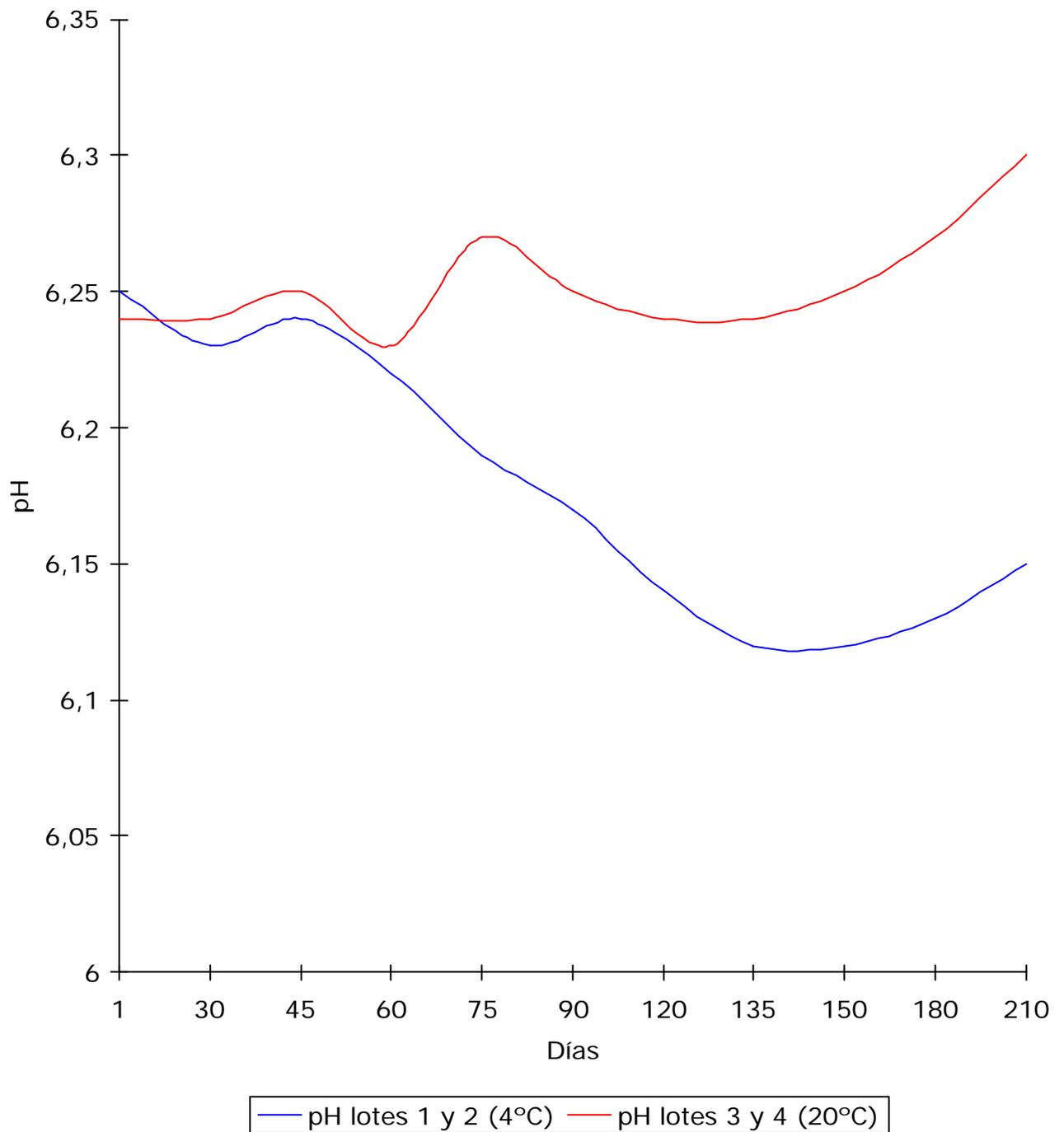
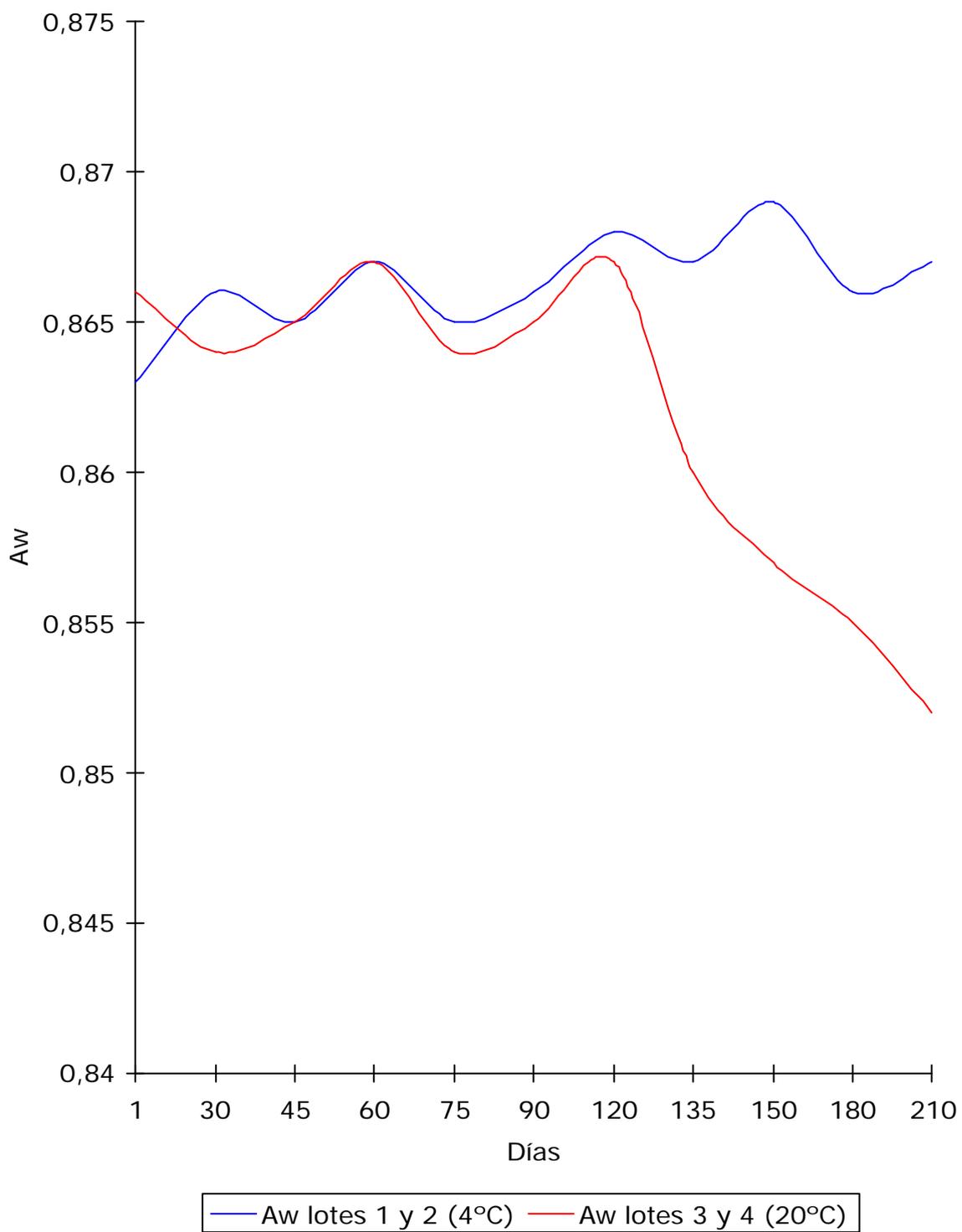


Figura 10. Evolución de la actividad de agua de la partida 4



2.6 Discusión de los resultados de la partida 4

En esta partida analizamos la posible influencia de los microorganismos de la flora acompañante en la supervivencia de *Listeria innocua*.

Los resultados obtenidos de *Listeria innocua* en los lotes 1 y 2 confirmaron los resultados de las partidas 1, 2 y 3. En este caso, la concentración de *Listeria innocua* disminuyó hasta 2 unidades logarítmicas.

Los microorganismos de la flora acompañante, como la flora láctica, los microorganismos del género *Micrococcus* y las bacterias mesófilas, se mantuvieron, en los lotes 1 y 2, entre 10^5 ufc/g y 10^7 ufc/g con ciertas oscilaciones pero siempre en concentraciones superiores a las de *Listeria innocua*.

Las concentraciones de los mohos y levaduras, en los lotes 1 y 2, tuvieron unas oscilaciones mayores que los microorganismos citados anteriormente y, además, los resultados del lote 2 estaban influenciados por el tratamiento con altas presiones. En el lote 1, las concentraciones fueron de 10^3 ufc/g a 10^6 ufc/g, mientras que las del lote 2 fueron de 10^2 ufc/g a 10^3 ufc/g.

En los lotes 1 y 2, el pH del producto disminuyó progresivamente desde valores de 6,25 hasta 6,15, a diferencia de la actividad de agua que aumentó con oscilaciones entre 0,863 y 0,867.

En los lotes 3 y 4, *Listeria innocua* disminuyó entre 2 y 3 unidades logarítmicas. Así mismo, la flora microbiana acompañante, la flora láctica, los microorganismos del género *Micrococcus* y las bacterias mesófilas, alcanzaron concentraciones altas llegando a valores de 10^6 ufc/g y 10^9 ufc/g. El pH en estos lotes aumentó desde los 6,24 hasta 6,30, mientras que la actividad de agua disminuyó desde 0,866 hasta 0,852.

Dejando aparte la influencia que tiene la temperatura, el pH y la actividad de agua en el crecimiento de *Listeria innocua*, tal como se ha analizado en las tres partidas anteriores, la flora microbiana acompañante pudo influir en

el crecimiento de *Listeria innocua*, posiblemente debido a la producción de metabolitos antimicrobianos y por la competición por los mismos nutrientes.

Las bacterias ácido lácticas inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas debido a la síntesis de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que provocan la disminución del pH del medio (Klaenhammer, 1988; Piard y Desmazeaud, 1991; Villani y col., 1994). Más concretamente, de Devlieghere y col. (2001) afirmaron que el crecimiento de *Listeria monocytogenes* está influenciado por la presencia de bacterias ácido lácticas cuando su concentración es superior a 10^7 ufc/g debido al incremento en el medio de la concentración del ácido láctico excretado al medio por estas bacterias. Según Foegeding y col. (1992), si la producción de ácido láctico de estas bacterias no es suficiente para inhibir el crecimiento de las bacterias del género *Listeria*, la producción de bacteriocinas es suficiente para reducir la flora microbiana patógena. Bouttefroy y col. (2000), demostraron que *Listeria monocytogenes* era sensible a la bacteriocina antilistérica curvatín 13 sintetizada por *Lactobacillus curvatus* SB13 que está presente en cualquier producto cárnico fermentado. Las bacterias del género *Staphylococcus* que son coagulasa negativas pueden sintetizar gran variedad de agentes antimicrobianos tales como enzimas bacteriolíticos y bacteriocinas que pueden tener un efecto antagonista para el crecimiento y desarrollo de las bacterias del género *Listeria* (Schindler y Schuhardt, 1965; Dajani y Wannamaker, 1969; Gagliano y Hindsill, 1970; Hsu y Wiseman, 1972; Jetten y Vogels, 1972; Eady y col., 1983; Villani y col., 1994).

La supervivencia de *Listeria innocua* en los lotes 1 y 2 es favorecida por dos factores: el mantenimiento de la temperatura de conservación del producto a 4°C, y por el mantenimiento de la actividad de agua en valores favorables para su crecimiento. Y desfavorecida por la disminución del pH del producto. Todos estos factores hacen que la flora acompañante se encuentre con unas condiciones desfavorables para su desarrollo, sobretodo por las bajas temperaturas, provocando unas cuotas bajas de crecimiento que influyen poco en la supervivencia y prevalencia de *Listeria innocua*.

Por el contrario, en los lotes 3 y 4, la temperatura es un elemento desfavorable para *Listeria innocua*, pero totalmente favorable para el crecimiento y desarrollo de la flora acompañante. La actividad de agua del producto es igualmente desfavorable para *Listeria innocua* pero no el pH, que aumenta hasta valores próximos a la neutralidad. Todos estos factores hacen que la flora acompañante, y a la vez competitiva, se desarrolle de forma sustancial produciendo metabolitos tóxicos o inhibidores para *Listeria innocua*, y que junto con la competencia por los nutrientes presentes entre las distintas bacterias provoca una disminución acentuada de las concentraciones de *Listeria innocua*. Por lo tanto, *Listeria innocua* tiene más comprometida su supervivencia en los lotes 3 y 4 que en los lotes 1 y 2.

Finalmente, la influencia que podía tener el tratamiento con altas presiones en la supervivencia de *Listeria innocua* en los lotes 2 y 4 no se ha demostrado determinante ni en las muestras de la partida nº 4 ni en las partidas nº 1, 2 y 3.

V. CONCLUSIONES

1. En las muestras de pechugas de pavo frescas destinadas a la elaboración de jamón de pavo curado objeto del estudio, no se detectó la presencia de *Listeria* spp ni de *Salmonella* spp.
2. *Salmonella choleraesuis* inoculada en las pechugas de pavo frescas no se detectó al final del proceso de maduración del producto (4 meses). Los factores responsables son la temperatura de refrigeración (4°C), la baja actividad de agua (0,873) y la concentración de sal (2,47%).
3. Durante la maduración y curado de las pechugas de pavo (salazón, refrigeración y secado) la población de *Listeria innocua* disminuyó 6 unidades logarítmicas. La supervivencia de *Listeria innocua* en esta etapa está comprometida por los valores bajos de pH (5,73), la actividad de agua baja (0,873) y la temperatura (4° y 12°C).
4. Los recuentos de *Listeria innocua* al finalizar la maduración del producto se mantuvieron constantes durante la vida comercial del mismo (6 meses) mantenido a 4°C y con valores de pH próximos a la neutralidad (6,19).
5. Los recuentos de *Listeria innocua* al finalizar la maduración del producto disminuyeron durante su vida comercial (6 meses) mantenido a 20°C, con valores de pH próximos a la neutralidad (6,28) y baja actividad de agua (0,851). Al séptimo mes el microorganismo no se detectó.
6. El tratamiento con altas presiones (400 MPa) no afecta al comportamiento y supervivencia de *Listeria innocua* durante la vida comercial del producto.

7. La flora acompañante del jamón de pavo curado afecta al comportamiento de *Listeria innocua*. A 4°C la flora acompañante no es suficiente para afectar a *Listeria innocua*. Sin embargo, a 20°C la competencia por los nutrientes y la producción de metabolitos bacterianos afectan a la supervivencia de *Listeria innocua*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aguado, V., Vitas, A. y Garcia-Jalón, I. 1997. Estudio comparativo de tres métodos de enriquecimiento para recuperación y aislamiento de *Listeria monocytogenes* en alimentos. Trabajo presentado en el X Congreso de Microbiología de los Alimentos. Valencia, septiembre 1996. Alimentaria, diciembre 1997.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozođlu, F. y Ray, B. 1998. Interaction of pressure, time and temperature of pressurization on viability loss of *Listeria innocua*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, vol. 14, 251-253.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C.P. y Ray, B. 1999. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. Applied and environmental Microbiology, september, (Vol) 4248-4251.
- Archer, D. L. y Young, F. 1988. Contemporary issues. Diseases with a food vector. Clinical Microbiology Reviews 1, 337-398.
- Artault, S., Bind, J. L., Delaval, J., Dureuil, Y. y Gaillard, N. 2000. AFNOR validation of the ALOA method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs. Laboratoire de Touraine. Le Bas Champeigné, Parçay-Meslay, Tours.
- Azadian, B., Finnerty, G. y Pearson, A. 1989. Cheese-borne *Listeria meningitis* in an immunocompetent patient. The Lancet, vol. I, 322-323.
- Baccus-Taylor, G., Glass, K. A., Luchansky, J. B. y Maurer, A. J. 1993. Fate of *Listeria monocytogenes* and pediococcal starter cultures during the manufacture of chicken summer sausage. Poultry Science 72, 1772-1778.
- Bailey, J. S., Fletcher, D. L. y Cox, N. A. 1989. Recovery and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* from broiler chickens in the Southeastern United States. Journal Food Protection 52, 148-155.

- Barnes, R., Archer, P., Strack, J. y Istre, G. 1989. Listeriosis associated with consumption of turkey franks. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, Vol. 38, 267-268.
- Bautista, D. A. Sylvester, N., Barbut, S. y Griffiths, M. W. 1997. The determination of efficacy of antimicrobial rinses on turkey carcasses using response surface designs. *International Journal of Food Microbiology* 34, 279-292.
- Bean, N. H. y Griffin, P. M. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogens, vehicles and trends. *Journal Food Protection* 53, 804-817.
- Bell, C. y Kyriakides, A. 1998. *Listeria. Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos*. Editorial Acibia, S.A.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8ª edition, 1986. Genus *Listeria*. Ed. Williamn & Wilkins.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9ª edition, 1994. Regular, nonsporing gram-positive rods. Group 19. Ed. Williamn & Wilkins.
- Bersani, C., Cantoni, C. y D'Aubert, S. 1991. Observation of the coagulase negative staphylococci (CNS) present in dry sausages. *Industrie Alimentari*, 12-14.
- Bille, J., Catimel, B., Bannerman, E., Jacquet, C., Yersin, M. N., Caniaux, I., Monget, D. y Rocourt, J. June 1992. API Listeria, a new and promising one-day system to identify Listeria isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 1857-1860.
- Blanco, M., Fernández-Garayzabal, J. F., Domínguez, L., Briones, V., Vázquez-Boland, J. A., Blanco, J. L., García, J. A. y Suárez, G. 1989. A technique for the direct identification of haemolytic-pathogenic listeria on selective plating media. *Letters Applied Microbiology*, 9, 125-128.

- Blivet, D., Salvat, G., Humbert, F. y Collin, P. 1997. Evaluation of a new enrichment broth for the isolation of *Salmonella* spp. from poultry products. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 211-216.
- Blom, H., Nerbrink, E., Dainty, R., Hagtvedt, T., Borch, E., Nissen, H. y Nesbakken, T. 1997. Addition of 2.5% lactate and 0.25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, sensory-acceptable served sausage and cooked ham stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 71-76.
- Blywick-Mckennal D. N. y Schaffner, D. W. 1994. Prediction of most probable number of *Listeria monocytogenes* using a generalized linear model and a modified FDA Listeria Isolation Method. *Journal of Food Protection* 57, 1052-1056.
- Bouttefroy, A., Linder, M. y Millière, J. B. 2000. Predictive models of the combined effects of curvaticin 13, NaCl and pH on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth. *Journal of Applied Microbiology* 88 (6), 919-929.
- Brenner, D. J. 1984. Facultatively anaerobic gram-negative rods, in Krieg, N. R. y Holt, J. C. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (Vol 1), Baltimore: Williams and Wilkins (408-516).
- Brewer, R. L., James, W. O., Prucha, J.C., Johnston, R. W., Alvarez, C. A., Kelly, W. y Bergeron E. A. 1995. Poultry processing line speeds as related to bacteriologic profile of broiler carcasses. *Journal of Food Science* 60 (5).
- Bryan, F. L. 1980. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. *Journal Food Protection* 43, 140-150.
- Bryan, F. L. 1988. Risk associated with vehicles of foodborne pathogens and toxins. *Journal Food Protection* 51, 498-508.
- Bryan F. L. y Doyle M. P. 1994. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *Journal of Food Protection* 58 (3), 326-344.

- Buchanan, R. L., Stahl, H. G. y Archer, D. L. 1987. Improved plating media for simplified, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Microbiology* 4, 269-275.
- Buchanan, R. L. y Klawitter, L. A. 1990. Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4,5. *Journal of Food Science* 55 (6), pages 1754-1756.
- Burn, C. G. 1936. Clinical and pathological features of an infection caused by a new pathogen of the genus *Listerella*. *American Journal of Pathology* 12, 341-348.
- Carlez, A. Cheftel, J. C.- Rosec, J. P., Richard, N., Saldana, J. L. y Balny, C. 1992. Effects of high pressure and bacteriostatic agents on the destruction of *Citrobacter freundii* in minced beef muscle. In *High Pressure and Biotechnology* 224, 365-368.
- Carlier, V., Augustin, J. C. y Rozier, J. 1996. Destruction of *Listeria monocytogenes* during a ham cooking process. *Journal of Food Protection* 59 (6), 592-595.
- Carpenter, S. L. y Harrison, M. A. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* on processed poultry. *Journal of Food Science* 54(3), 556-558.
- Carramiñana, J.J., Yangüela, J., Blanco, D., Rota, C., Agustín, A.I., Ariño, A y Herrera, A. 1997. *Salmonella* incidence and distribution of serotypes throughout processing in spanish poultry slaughterhouse. *Journal of Food Protection* 60(11), 1312-1317.
- Catteau, M. 1993. *Listeria* et aliments. Institut Pasteur de Lille. Service de Microbiologie et Hygiène des Aliments (SERMHA).
- C. D. C. 1998. Morbidity and Mortality Weekly Report. December 25. Multistate outbreak of Listeriosis, United States, 1998. 47(50); 1085-1086.

- C. D. C. 2000. Morbidity and Mortality Weekly Report. December 22. Multistate outbreak of Listeriosis, United States, 2000. 49 (50); 1129-1130.
- C. D. C. 2001. Morbidity and Mortality Weekly Report. July 06. Outbreak of Listeriosis associated with homemade mexican-style cheese, North Carolina, October 2000-January 2001. 50 (26); 560-562.
- Chalker, R. B. y Blaser, M. J. 1988. A review of human salmonellosis: Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. Review Infection Diseases 10, 111-124.
- Chasseignaux, E., Toquin, M.-T., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P. y Ermel, G. 2001. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry – and pork – processing plants. Journal of Applied Microbiology 91 (5), 888-899.
- Cheftel, J. C. 1992. Effect of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In High Pressure and Biotechnology 224, 195-209.
- Clouser C. S., Doores S., Mast M. G. and Knabel S. J. 1995. The role of defeathering in contamination of turkey skin by *Salmonella* species and *Listeria monocytogenes*. Poultry Science 74, 723-731.
- Cohen, M. L. y Tauxe, R. V. 1986. Drug-resistant *Salmonella* in the United States: An epidemiologic perspective. Science 234, 964-969.
- Cole, M. B., Jones, M. V. y Holyoak, C. 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Bacteriology 69, 63-72.
- Conner, D. F., Brackett, R.E. y Beuchat, L. R. 1986. Effect of temperature, NaCl and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. Applied and Environmental Microbiology 52, 59-63.
- Corlett, Jr. D. A. y Brown, M. H. 1980. PH and acidity. In microbial ecology of foods. Factors affecting life and death of microorganisms. Vol. 1.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods
p. 62. New York: Academic Press.

Cox, L. J., Kleiss, T., J. L. Cordier, Cordellana, C., Konkel, P., Pedrazzini, C.,
Beumer. R. y Siebenga. A. 1989. *Listeria* spp. in food processing,
non-food and domestic environments. *Food Microbiology* 6, 49-61.

Curiale, M. S. y Lewus, C. 1994. Detection of *Listeria monocytogenes* in
samples containing *Listeria innocua*. *Journal Food Protection*, 57.

D'Aoust, J. Y., Aris, B. J., Thisdele, P., Durante, A., Brissow, N., Dragon, D.,
Lachapelle, G., Johnston, M y Laidley, R. 1975. *Salmonella*
eastborne outbreak associated with chocolate. *J. Inst. Cand. Sci.*
Technol. Aliment. 4, 1075.

D'Aoust. J-Y. 1980. Update on preenrichment and selective enrichment
conditions for detection of *Salmonella* in foods. *Journal of Food*
Protection 44 (5), 369-374.

D'Aoust, J. Y. 1985. Infective dose of *Salmonella typhimurium* in cheddar
cheese. *Am. J. Epidemiol.* 122, 717-720.

D'Aoust J-Y. 1988. *Salmonella*. Health Protection Branch, Health and
Welfare Canada, Sir Frederick G. Banting Research Centre, Ottawa,
Ontario, Canada.

D'Aoust, J-Y, Sewell, A. M. y Daley, E. 1992a. Inadequacy of small transfer
volume and short (6h) selective enrichment for the detection of
foodborne *Salmonella*. *Journal of Food Protection* 55 (5), 326-328.

D'Aoust, J-Y., Sewell, A. M. y Warburton, D.W. 1992b. A comparison of
standard cultural methods for the detection of foodborne
Salmonella. *International Journal of Food Microbiology* 16, 41-50.

D'Aoust, J-Y. 1994. *Salmonella* and the international food trade.
International Journal of Food Microbiology 24, 11-31.

- D'Aoust, J-Y., Sewell, A. M. y McDonald, C. 1995. Recovery of *Salmonella* spp. from refrigerated preenrichment cultures of dry food composites. *Journal of AOAC International* 78 (5).
- Dajani, A. S. y Wannamaker, L. W. 1969. Demonstration of bactericidal substance against β -haemolytic streptococci in supernatant fluids of staphylococcal cultures. *Journal of Bacteriology* 97, 985-991.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A. H., Versyck, K. J., Vandewaetere, B. Van Impe, J. y Debevere, J. 2001. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiology* 18, 53-66.
- Dickson, J.S. y Anderson, M. E. 1992. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: a review. *Journal Food Protection* 55, 133-140.
- Donnelly, A. W. 1987. Historical prespectives on methodology to detect *Listeria monocytogenes*. Presented at the workshop on Listeria Methodology, 101st AOAC Annual International Meeting. September 14-17. San Francisco. CA. USA.
- Duggan, J. y Phillips C. A. 1998. Listeria in the domestic enviroment. *Nutrition and Food Science* 2, 73-79.
- Eady, E. A., Holland, K. T. y Cunliffe, W. J. 1983. Production and partial purification of peptide antibiotic from *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Applied Bacteriology* 55, 461-472.
- Farber, J. M. 1989. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Journal Food Microbiology* 8, 285.
- Farber, J. M. y Peterkin, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiology Review*. 55, 476-511.
- Farber, J. M., Coates, F. y Daley, E. 1992. Minimum water activity requeriments for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 15, 103-105.

- Firstenberg-Eden, R. 1981. Attachment of bacteria to meat surfaces: A review. *Journal Food Protection* 44, 602-607.
- Flanders, K. J. y Donnelly, C. W. 1994. Injury, resuscitation and detection of *Listeria* spp. from frozen environments.. *Food Microbiology* 11, 473-480.
- Foegeding, P. M., Thomas, A. B., Pilkington, D. H. y Klaenhammer, T. R. 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (3), 884-890.
- Fontaine, R. E., Cohen, M. L., Martin, W. T. y Vernon, T. M. 1980. Epidemic salmonellosis from cheddar cheese: surveillance and prevention. *Am. J. Epidemiol.* 111, 247-253.
- Franco, C. M., Quinto, E. J., Fente, C., Rodriguez-Otero, J. L., Dominguez, L. y Cepeda, A. 1995. Determination of the principal sources of *Listeria* spp. contamination in poultry meat and a poultry processing plant. *Journal of Food Protection* 58 (12), 1320-1325.
- Gagliano, V. J. y Hindsill, R. D. 1970. Characterisation of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. *Journal of Bacteriology* 104, 117-125.
- Garcia-Aguado, J. M. y Úbeda, P. Diciembre 1998. Estudio comparativo de dos métodos para la investigación de *Listeria monocytogenes* en los productos alimentarios. *Cuadernos de microbiología* 10, 4-5.
- Garriga, M., Aymerich, M. T. y Hugas, M. 2002. Tecnologías emergentes en la conservación de productos cárnicos: altas presiones hidrostáticas en jamón cocido loncheado. *Eurocarne* 104, 77-83.
- Genigeorgis, C.A., Oanca, F. y Dutulescu, D. 1990. Prevalence of *Listeria* spp. in turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. *Journal of Food Protection* 53 (4), 282-288.
- Georgala, D. L. y Hurst, A. 1963. The survival of food poisoning bacteria in frozen foods. *Journal of Applied Bacteriology* 26, 346-358.

- George, S. M., Lund, B. M. y Brocklehurst, T. F. 1988. The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology 6, 153-156.
- Gerba, C. P., Rose, J. B. y Haas, C. N. 1996. Sensitive populations: who is at risk?. International Journal Food Microbiology 30, 113-123.
- Gnanou Besse, N., Dubois Brissonnet, F., Lafarge, V. y Leclerc, V. 2000. Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology 89 (6), 944-950.
- Golden, D. A., Beuchat, L. R. Y Brackett, R. E. 1987. Direct Plating Technique for Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Presented at the Workshop on Listeria methodology, 101st AOAC Anual International Meeting, Sept. 14-17, San Francisco.CA. USA.
- Golden, D. A., Beuchat, L. R. y Brackett, R. E. 1988. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as a affected by heating and freezing. Food Microbiology 5, 17-23.
- Gray, M. L. y Killinger, A. H. 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bacteriological Reviews 30, 309-382.
- Greenwood, M. H. 1983. Chocolate bars contaminated with *Salmonella napolii*: an infectivity study. Br. Med. J. 286. 1394.
- Hammes, W. P., Bantleon, A. y Min, S. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS Microbiological Review 87, 165-174.
- Hauschild, A. H. W. Y Bryan, F. L. 1980. Estimate of cases of food and water-borne illness in Canada and United States. Journal Food Protection 43, 435-440.
- Hayashi, R. 1992. Utilization of pressure in addition to temperature in food science and technology. High Pressure and Biotechnology 224, 185-193.

- Hennessy, T. W., Hedberg, C. W., Slutzker, L., White, K. E., Besser-wiek, J. M., Moen, M. E., Feldman, J., Coleman, W. W., Edmonson, L. M., Macdonald, K. L., Osterholm, M. T. y the investigation team. 1996. A national outbreak of *Salmonella enteritidis* infections from the ice cream. N. Engl. J. Med. 334. 1281-1286.
- Hof, H. 1984. Virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* serovar 1 / 2 a. Med. Microbiol. Immunol. 173, 207-210.
- Hof, H. y Rocourt, J. 1992. Is any strain of *Listeria monocytogenes* detected in food a health risk?. International Journal of Food Microbiology 16, 173-182.
- Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A. O., Farkas, D. A. y Knorr, D. 1989. Biological effects of high hydrostatic pressure on foods microorganisms. Food Technology 43, 99-107.
- Hoover, D. G. 1993. Pressure effect on biological systems. Food Technology 47, 150-155.
- Horwitz, M. y Gangarosa, E. J. 1976. Foodborne disease outbreaks traced to poultry, United States, 1966-1974. Journal Milk Food Technology 39, 859-863.
- Hsu, C. Y. y Wiseman, G. M. 1972. The nature of epidermidins, new antibiotics from staphylococci. Canadian Journal of Microbiology 18, 121-125.
- Hudson, W. R. y Mead, G.C. 1989. Listeria contamination at a poultry processing plant. Letters in Applied Microbiology 9, 211-214.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies). 1996. *Salmonellae*. Microorganisms in Foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie academic & Professional. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. U.S.A.

- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies). 1996. *Listeria monocytogenes*. Microorganisms in Foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie academic & Professional. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. U.S.A.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies). 1998. Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. U.S.A.
- Iriarte, J. y Villanueva, M^a R. 1993. Método rápido de detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en carne y productos cárnicos. Alimentación, equipos y tecnología. Septiembre, 65-72.
- Jetten, A. M. y Vogels, G. D. 1972. Nature and properties of a *Staphylococcus epidermidis* bacteriocin. Journal of Bacteriology 112, 243-250.
- Johnson, J. L., Doyle, M. P. y Cassens, R. G. 1990. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in meat and meat products: a review. Journal Food Protection 53, 81.
- Juntilla, J y Brander, M. 1989. *Listeria monocytogenes* septicemia associated with consumption of salted mushrooms. Scandinavian Journal of Infection 21, 339-342.
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C. P. y Ray, B. 1996. Viability loss kinetics of food spoilage and pathogenic bacteria at a moderate hydrostatic pressure. Activities Report of the R & D Associates 49, 331-341.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C. P. y Ray, B. 1998a. Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. Journal of Food Protection 61 (4), 425-431.

- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C. P. y Ray, B. 1998b. Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiology* 15, 207-214.
- Kerr, K. G., Birkenhead, D., Seale, K., Major, J. y Hawkey, P. M. 1993. Prevalence of *Listeria* spp. on the hands of food workers. *Journal of Food Protection* 56 (6), 525-527.
- Khakhria, R., Woodward, D., Johnson, W. M. y Poppe, C. 1997. *Salmonella* isolated from humans, animals and other sources in Canada, 1983-92. *Epidemiology Infection* 119, 15-23
- Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337-349.
- Knorr, D. 1993. Effect of high hydrostatic pressure process on food safety and quality. *Food Technology* 47, 156-161.
- Knorz, W. y Hof, H. 1986. Zur Pathogenität von Listerien. *Infekt Immun.* 14, 76-80.
- Lillard, H. S. 1988. Effect of surfactant or changes in ionic strength on the attachment of *Salmonella typhimurium* to poultry skin and muscle. *Journal Food Science* 53, 727-730.
- Line J. E. y Harrison M. A. 1992. *Listeria monocytogenes* inactivation in turkey rolls and battered chicken nuggets subjected to simulated commercial cooking. *Journal of Food Science* 57 (3), 787-793.
- Luchansky, J. B., Glass, K. A., Harsono, K. D., Degnan, A. J., Faith, N. G., Cauvin, B., Baccus-taylor, G., Arihara, K., Bater, B., Maurer, A. J. y Cassens, R. G. 1992. Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3053-3059.
- Ludwig, H., Bieler, C., Hallbauer, K. y Scigalla, W. 1992. Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure. *High Pressure and Biotechnology* 224, 25-32.

- Mackey, B. M., Pritchett, C., Norris, A y Mead, G. C. 1990. Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. Letters in Applied Microbiology 10, 251-255.
- Mackey, B. M., Forestière, K., Isaacs, N. S., Stenning, R. y Brooker, B. 1994. The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. Letters in Applied Microbiology 19, 429-432.
- Maguire, H. 1993. Continuing hazards from unpasteurized milk products in England and Wales. International Food Safety News 2, 21-22.
- Marshall, D. L. y Schmidt, R. H. 1991. Physiological evaluation of stimulated growth of *Listeria monocytogenes* by *Pseudomonas* species in milk. Canadian Journal Microbiology 37, 594-599.
- Mazzotta, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W. y Scott, V. N. 2001. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 64 (3), 410-429.
- McClure, P. J., Roberts, T. A. y Oguru, P. O. 1990. Comparison of the effects of NaCl, pH, and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. Letters in Applied Microbiology 9, 95-99.
- McLauchlin J. 1987. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. Journal of Applied Bacteriology 63,1-11.
- McLauchlin, J. 1994. Serendipitous microbiology and the epidemiology of listeriosis. The W. H. Pierce memorial symposium. Proceedings of a symposium held on 17 march 1993. London.
- Mead, G. C. 1982. Microbiology of the poultry and game birds. pp. 67-101. M. H. Brown (ed.). Meat Microbiology. Applied Science Publications Ltd., London.

- Mioni, R., Grimaldi, G., Bordin, P., Miglioranzi, F. y Ferrigno, R. 1998. Investigación de *Listeria monocytogenes* en los alimentos: validación de un nuevo medio de cultivo selectivo y diferencial especie-específico y de un sistema rápido de identificación. Cuadernos de Microbiología 9, 7-9.
- Mulder, R. W. A. W., Notermans, S. y Kampelmacher, E. H. 1977. Inactivation of *salmonellae* on chilled and deep frozen broiler carcasses by irradiation. Journal Applied Bacteriology 42, 179-185.
- Murano, E. A., Murano, P. S., Brennan, R. E., Shenoy, K. y Moreira, R. G. 1999. Application of high hydrostatic pressure to eliminate *Listeria monocytogenes* from fresh pork sausage. Journal of Food Protection 62 (5), 480-483.
- 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*. Journal of Pathology and Bacteriology 29, 407-439.
- Nolan, D. A., Chamblin, D. C. y Troller, J. A. 1992. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. International Journal of Food Microbiology 16, 323-335.
- Norme Française NF ISO 6579, décembre 1993. Directives générales concernant les méthodes de recherche des Salmonella. (Correspondance: le présent document reproduit intégralement la norme internationale ISO 6579:1993).
- Notermans, S., van Schothorst, M. van Leusden, F. M. y Kampelmacher, E. H. 1975. Contamination of broiler chickens by *Salmonella* during processing in a number of poultry-processing plants. Tijdschr. Diergeneesk. 100, 259-264.
- Oh, Deog-Hwan y Marshall, D. L. 1996. Monolaurin and acetic acid inactivation of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel. Journal of Food Protection 59 (3), 249-252.

- Olsen, J. A., Yousef, A. E. y Marth, E. H. 1988. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* during making and storage of butter. *Milchwissenschaft* 43 (8), 487-489.
- Palumbo, S. A. y Williams, A. C. 1991. Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. *Food Microbiology* 8, 63-68.
- Piard, J. C. y Desmazeaud, M. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: oxygen metabolites and endproducts from catabolism. *Lait* 71, 525-541.
- Pine, L., Kathariou, S., Quinn, F., George, V., Wenger, J. D. y Weaver, R.E. 1991. Cytopathogenic effects in enterocytelike Caco-2 cells differentiate virulent from avirulent *Listeria* strains. *Journal Clinical Microbiology* 29, 990-996.
- Pini, P. N. y Gilbert, R. J. 1988. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chicken and soft cheeses. *International Food Microbiology* 6, 317.
- Pirie, J. H. H. 1940. *Listeria*: Change of name for a genus of bacteria. *Nature* 145, 264.
- Plachá, I., Venglovský, J., Sasáková, N. y Svoboda, I. F. 2001. The effect of summer and winter seasons on the survival of *Salmonella typhimurium* and indicator microorganisms during the storage of solid fraction of pig slurry. *Journal of Applied Microbiology* 91 (6), 1036-1043.
- Ponce, E., Pla, R., Mor-mur, M., Gervilla, R. y Guamis, B. 1998. Inactivation of *Listeria innocua* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection* 61(1), 119-122.
- Ponce, E., Pla, R., Sendra, E., Guamis, B y Mor-mur, M. 1999. Destruction of *Salmonella enteritidis* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: comparative study in selective and non-selective media. *Food Microbiology* 16, 357-365.

- Ralovich, B. 1984. Listeriosis research: present situation and perspective. Budapest: Akademiai Kiado.
- Ray, B. 1979. Methods to detect stressed microorganisms. *Journal Food Protection* 42, 346-355.
- Rijpens, N. P., Jannes, G. y Herman L. M. F. 1997. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken and turkey products determined by polymerase chain reaction and line probe assay hybridization. *Journal of Food protection* 60 (5), 548-550.
- Rocourt, J. 1991. Human listeriosis, 1989. WHO/HPP/FOS/91.3.
- Roering, A. M., Wierzba, R. K., Ihnot, A. M. y Luchansky, J. B. 1998. Pasteurization of vacuum-sealed packages of summer sausage inoculated with *Listeria monocytogenes*. *Journal Food Safety* 18, 49-56.
- Sadik, C., Krending, M. J., Mean, F., Aubort, J. D., Schneider, P. A. y Roussianos, D. 1986. An epidemiological investigation following an infection by *Salmonella typhimurium* due to the ingestion of cheese made from raw milk. Proc. 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications, 1, Berlin, 280-282.
- Schindler, C. A. y Schuhardt, V. T. 1965. Purification and properties of lysostaphin: a lytic agent for *Staphylococcus aureus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 97, 242-250.
- Schlech, W. F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S. y Broome, C. V. 1982. Epidemic Listeriosis. Evidence for transmission by food. *The new england journal of medicine* 308 (4), 203-206.
- Schmidt, U. y Kaya, M. 1991. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en rodajas de embutido escaldado envasadas al vacío. *Fleischwirtsch español*, 1.

- Schoeni, J. L., Brunner, K. y Doyle, M. P. 1991. Rates of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beef and fermented beaker sausage. *Journal of Food Protection* 54 (5), 334-337.
- Seeliger, H. P. R. 1961. *Listeriosis*. 2nd edition. pp. 37. Basel:Karger.
- Shineman T. L. y Harrison M. A. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* on different muscle tissues. *Journal of Food Protection* 57 (12), 1057-1062.
- Simpson, R. K. y Gilmour, A. 1997a. The effect of high hydrostatic pressure on the activity of intracellular enzymes of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 25, 48-53.
- Simpson, R. K. y Gilmour, A. 1997b. The effect of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and model food systems. *Journal of Applied Microbiology* 83, 181-188.
- Skovgaard, N. y Morgen, C-A. 1988. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology* 6, 229-242.
- Sorrells, K. M., Enigl, D. C. y Hatfield, J. R. 1989. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal Food Protection* 52, 571-573.
- Swaminathan, B., Link, M. A. B. y Ayres, J. C. 1978. Incidence of *salmonellae* in raw meat and poultry samples in retail stores. *Journal Food Protection* 41, 518-520.
- Swaminathan, B., Hayes, P. S. y Przybyszewski, V. A. 1988. Evaluation of enrichment and plating media for isolating *Listeria monocytogenes*. *Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71 (3), 256-264.
- Tamblyn, K. C., Conner, D. E., Bilgili, S. F. y Hall, G. S. 1993. Utilization of the skin attachment model (SAM) to determine the antibacterial activity of potential carcass treatments. *Poultry Science* 72, 100.

- Tamblyn, K.C. y Conner, D.E. 1997a. Bactericidal activity of organic acids in combination with transdermal compounds against *Salmonella typhimurium* attached to broiler skin. *Food Microbiology* 14, 477-484.
- Tamblyn, K. C. y Conner, D. E. 1997b. Bactericidal activity of organic acids against *Salmonella typhimurium* attached to broiler chicken skin.. *Journal of Food Protection*, Vol. 60, nº 6, 629-633.
- Tapia de Daza, M. S., Villegas, Y. y Martinez, A. 1991. Minimal water activity for growth of *Listeria monocytogenes* as affected by solute and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 14, 333-337.
- Tholozan, J. L., Ritz, M., Jugiau, F., Federighi, M. y Tissier, J. P. 2000. Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology* 88 (2), 202-212.
- Thomas, C. J. y McMeekin, T. A. 1980. Contamination of broiler carcass skin during commercial processing procedures: an electron microscopic study. *Applied Environment Microbiology* 40, 133-144.
- Thomas, C. J. y McMeekin, T. A. 1981. Attachment of *Salmonella* spp. to chicken muscle surfaces. *Applied Environment Microbiology* 42, 130-134.
- Thomas, C. J. y McMeekin, T. A. 1982. Effect of water immersion on the microtopography of the skin of chicken carcasses. *Journal Science Food Agriculture* 33, 549-554.
- Thomas, C. J., McMeekin, T. A. y Patterson, J. T. 1987. Prevention of microbial contamination in the poultry processing plant. pp. 163-179. F. J. A: Smulders (ed.). *Elimination of Pathogenic Organisms from Meat and Poultry*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Thomson, J. E., Banwart, G. J., Sanders, D. H. y Mercuri, A. J. 1967. Effect of chlorine, antibiotics, B-propiolactone, acids and washing on

Salmonella typhimurium on eviscerated fryer chickens. Poultry Science 46, 146-151.

Tokumaru, M., Konuma, H., Umesako, M., Konno, S. y Shinagawa, K. 1990. Rates of detection of *Salmonella* and *Campylobacter* in meats in response to sample size and the infection level of each species. International Journal Food Microbiology 13, 41-46.

Uyttendaele, M. R., Neyts K. D., Lips, R. M. y Debevere, J. M. 1997. Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products obtained from Belgian and French abbatoirs. Food Microbiology 14, 339-345.

Villani, F., Pepe, O., Mauriello, G., Salzano, G., Moschetti, G. y Coppola, S. 1994. Antimicrobial activity of *Staphylococcus xylosus* from italian sausages against *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology 18, 159-161.

Vlaemynck, G., Lafarge, V. y Scotter, S. Mar 2000. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. Journal of Applied Microbiology 88 (3), 430-441.

Vought, J. V. y Tatini, S. R. 1998. *Salmonella enteritidis* contamination of ice cream associated with a 1994 multistate outbreak. Journal of Food Protection 61 (1), 5-10.

Walker, S. J., Archer, P. y Banks, J. G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. Journal of Applied Bacteriology 68, 157-162.

Weis, J. y Seeliger, H. P. R. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Applied Microbiology 30, 29-32.

Wirsin von Koenig, C. H., Heymer, B., Hof, H. y Finger, H. 1983. Course of infection and development of immunity in experimental infection of mice with *Listeria* serotypes. Infect. Immun. 40, 1170-1177.

Yu, L.S.L. y Fung, D.Y.C. 1991. Evaluation of FDA and USDA procedures for enumerating *Listeria monocytogenes* in ground beef. Food microbiology 8, 69-74.