



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

INCIDENCIA DE *Listeria monocytogenes*  
E N A L I M E N T O S

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUIMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
ANABEATRÍZ MARTINEZ SANCHEZ



MEXICO , D. F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. PEDRO VALLE VEGA

Vocal: Prof. MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE

Secretario: Prof. MIGUEL HIDALGO TORRES

1er suplente: Prof. LETICIA GIL VIEYRA

2do suplente: Prof. LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ

Sitio en donde se desarrollo el tema: BIBLIOTECA FACULTAD DE QUÍMICA

Asesor del tema:

---

Dr. Pedro Valle Vega

Sustentante:

---

Ana Beatriz Martínez Sánchez

## AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por estar siempre a mi lado y por permitirme culminar esta etapa.

A **mis Padres:** Con la mayor gratitud por los esfuerzos realizados para que yo terminara mi Carrera Profesional siendo para mí la mejor herencia.

A mi Madre que es el ser más maravilloso del mundo. Gracias por el apoyo moral, en cariño y comprensión que desde pequeña, me ha brindado, por guiar mi camino y estar siempre junto a mi en los momentos más difíciles.

A mi Padre porque siempre ha sido para mi un hombre grande y maravilloso, que siempre he admirado.

Gracias por guiar mi vida con energía, esta es la que ha hecho de mi lo que soy.

Siendo este trabajo de ustedes. Con amor, respeto y admiración.

A **mi hermano Sergio:** por ser mi compañero y confidente en todo momento. Te quiero mucho.

A **Victor:** Gracias mi cielo estar a mi lado, por tu apoyo y amor “Los que de corazón se quieren sólo con el corazón se hablan”. Te Amo

Al **Dr. Pedro Valle.** Por todos sus consejos y enseñanzas, le agradezco el apoyo y la paciencia en la realización de este trabajo. Pero principalmente muchas gracias por creer en mí.

A **mi Abue Etelvina, a mi tía Maruca, a mi primo Tavo.** Con todo mi cariño

A todos **mis Maestros** por su paciencia y por brindarme sus conocimientos

A **Norma, Itzel, Karla y Silvia.** “Nuestros amigos son los hermanos que Dios olvidó darnos “. Gracias por sus consejos y amistad.

A todos **mis amigos y compañeros.** Por su cariño y amistad (Sandra V., Jessica, Adrián, Gaby, Mayela, Bárbara, Erandi, Luz, Diego, Ángel, Edson, Luis, Israel, Demetrio Morales, Leonardo, Enrique)

A la **familia Mendoza Azua** por abrirme las puertas de su casa y corazón (Jovita, Xavier, Carol y Horacio)

A la **familia Martínez Rico** (Ethel, Teté y Riky). Con mucho cariño

A mis **amigos y jefes** de **Silliker** por la oportunidad de crecimiento personal y profesional. Con cariño especial para todos ustedes. (Garry, Israel, Brenda, Rosario, I.A Karina, I.Q Fabián, Q.Emma, C.P Lulú, Ing. Agustín)

Finalmente agradezco a mi **tío Antonio Gómez** por el apoyo que siempre me ha brindado.

## INDICE

Pág.

INTRODUCCION.....	1,2	
OBJETIVOS.....	3	
CAPITULO I .GENERALIDADES		
1.1 Historia y Antecedentes.....	4 - 7	
1.2 Morfología y Fisiología.....	8 -9	
1.3 Pruebas de identificación.....	9 - 16	
1.4 Sobrevivencia.....	16 - 17	
CAPITULO II. PAPEL PATÓGENO.....		18
2.1 Listerosis.....	18 - 22	
2.2 Repercusiones económicas y en la salud.....	23	
CAPITULO III. INCIDENCIA EN ALIMENTOS.....		24 - 26
CAPITULO IV. MÉTODOS DE CONTROL DE LISTERIA		
4.1 Factores que influyen su desarrollo en plantas procesadoras de alimentos.....	26 - 27	
4.2 Lugares de incidencia.....	27 - 28	
4.3 Acciones preventivas y correctivas		
4.3.1 Buenas prácticas de manufactura, HACCP.....	28 - 36	
4.3.2 Monitoreos .....	37	
4.3.3 Contaminación cruzada.....	37 - 38	
4.3.4 Desinfección.....	38 - 41	
4.3.4 Tratamiento térmico.....	41	
CAPITULO V. <i>Listeria monocytogenes</i> en México.....		42 - 46
CONCLUSIONES.....		47
BIBLIOGRAFIA.....		48-55

## INTRODUCCION

El presente trabajo monográfico de actualización pretende mostrar la importancia e incidencia de *Listeria monocytogenes* en los alimentos, microorganismo patógeno ampliamente distribuido en la naturaleza. En los últimos años ha sido uno de los problemas mas frecuentes que atañe a la industria alimentaria a nivel mundial, provocando pérdidas económicas y enfermedades graves que han causado muertes principalmente en individuos vulnerables (niños, mujeres embarazadas y ancianos), no obstante; no es excluyente al resto de la población.

Las enfermedades de transmisión alimentaria provocadas por alimentos constituyen el mayor peligro actual para la salud al nivel internacional, dado que los productos alimenticios representan la fuente principal de riesgo respecto a los agentes químicos y biológicos, y que afectan a todos los países independientemente de su nivel de desarrollo.

En conferencia internacional FAO/OMS sobre nutrición, celebrada en Roma 1992 (FAO, 2006) se reconoció que los alimentos contaminados representan la fuente de enfermedades transmisibles y no transmisibles que causan sufrimientos a millones de personas en todo el mundo. La OMS ha notificado que los siete agentes patógenos principales (*Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *E.coli* 0157:H7, ***Listeria monocytogenes***, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasmodium gondii*) causan entre 3,3 y 12,3 millones de casos de infección solamente en Estados Unidos, su incidencia podría ser de 300 a 350 veces mayor de lo que indican las estadísticas. Se ha estimado que el 70 por ciento de los 1 500 millones aproximadamente de episodios de diarrea que se verifican cada año en todo el mundo, muchos de los cuales llevan a la muerte, son causados directamente por la contaminación química o biológica de los alimentos comercializados en el plano internacional, por lo tanto hay muchos motivos que llevan a pensar que en los países en desarrollo se notifica a las autoridades sanitarias una proporción de casos aun inferior, debido principalmente a la pobreza y a la escasez de recursos a disposición de los servicios de gestión de la inocuidad alimentaria y de inspección de alimentos. Aunque las estadísticas referentes a este tema son escasas, hay suficientes testimonios para demostrar que el problema tiene

un alcance mundial y es suficientemente grave para atraer la atención de los gobiernos y la industria alimentaria sobre la calidad en relación con la inocuidad de los alimentos. (OMS, 1999)

Uno de los factores que desempeña una función importante en la epidemiología de los nuevos productos relacionados con los alimentos lo constituye el ambiente contaminado, pobreza y falta de instalaciones aptas para la preparación de los alimentos.

En países en desarrollo donde la industria alimentaria abarca muchas empresas pequeñas que no están bien informadas acerca de las cuestiones de la inocuidad alimentaria o de sus responsabilidades a este respecto. Con frecuencia se conocen muy poco o desconocen del todo las tecnologías modernas, las buenas prácticas de fabricación, las prácticas de higiene, el sistema HACCP y el control de calidad. (OPS, 1999)

## OBJETIVOS

- Mediante la presente revisión bibliográfica se pretende mostrar un panorama general de *Listeria monocytogenes*, su importancia e incidencia en los alimentos
- Se dará a conocer su situación actual a nivel nacional y mundial
- Se presentarán los métodos de control de la *Listeria monocytogenes*

# CAPITULO 1. GENERALIDADES

## 1.1 Historia y Antecedentes

La historia en la inocuidad alimentara fue iniciada desde tiempos antiguos en donde se trataba de reconocer y evitar alimentos que eran tóxicos naturalmente. Los primeros humanos probablemente tras prueba y error empezaron el descubrimiento de formas básicas de preservación de los alimentos (secado, salado y fermentación). Los chinos reportan preservación de vegetales por fermentación y Plinius preservación de col en recipientes de barro. En 2000A.C el libro Leviticus menciona el lavado de las ropas después del sacrificio de los animales, egipcios, griegos y romanos hacen mención a esta práctica. Antonie Van Leeuwenhoek iniciador del primer impacto en la industria de alimentos con sus estudios de microbiología. En 1800 D.C. el trabajo reportado por Nicholas Appert en donde se menciona los orígenes de los procesos térmicos comerciales. 1857 D.C. Pasteur combina estos avances con la medicina surgiendo una nueva era para la microbiología, que a la fecha se sigue utilizando. 1880 D.C. Gartner logra el primer aislamiento de *Salmonella* en alimentos. De 1880 a la fecha Salmon, Russell, Frazier entre otros empezaron la era de oro de la microbiología, en donde se crearon textos importantes sobre microbiología: Food Poisoning and Infections, Investigation of Food Disease Outbreaks and Microbiology of Food Plant Sanitation y Food Microbiology and Food Safety into the Next Millennium (Griffith, 2006)

### Lista de sucesos:

*Listeria monocytogenes* fue descubierta en 1926 (Doyle, 2001, Oliver, 1990).

1966 (Alemania) 279 casos de abortos consumo de leche pasteurizada, carne de vaca cruda (Jay, 2000)

1979 (Boston) 23 casos de contaminación por consumo de leche pasteurizada (Jay, 2000)

1980s La *Listeria monocytogenes* emerge como un problema público asociado a productos lácteos y a alimentos procesados. (Gallegher, 2003)

1980 (Nueva Zelanda) 22 casos de listeriosis perinatal, produciéndose 6 muertes de fetos y 1 de un nacido vivo. No se determinó la causa, aunque se pensó que pudieron ser debidas al consumo de marisco y de pescado crudo (Jay, 2000)

1981 (EUA) Se reconoce a la *Listeria monocytogenes* como patógeno en los alimentos (Doyle, 2001)

1981 (Nueva Escocia, Canadá) Primer brote, producido por el consumo de ensalada de coles en. Las coles habían sido conservados en refrigeración por un período prolongado, factor que originó el crecimiento de *L. monocytogenes*. Los coles se cultivaron en campos en los que habían pastado ovinos cuya materia fecal contaminó la tierra con *L. monocytogenes*. (FAO, 2006)

1983 (Boston) Brote a 49 personas en Leche pasteurizada. (Jay, 2000)

1983-1985 (Suiza) 122 casos en personas por consumo de queso blanco (Jay, 2000, Sharp, 1994)

1985 (Los Ángeles): 86 casos de infección por *L. monocytogenes* en Los Ángeles y California. Queso estilo mexicano 150 casos, 48 muertes. (Doyle, 2001; Cortez, 2006)

1986-1987 (Filadelfia) 36 casos en un periodo de 5 meses (16 muertes incluidos 2 recién nacidos), posible origen de queso Brie, helados, salami y hortalizas (Jay, 2000)

1986 (E.U) Brote de *L. monocytogenes* en helados (Roser, 1999)

1988 (Reino Unido) Una mujer dio a luz a un niño muerto 5 días antes de que se presentara síntomas parecidos a lo de la gripe, origen más probable, el pollo cocido refrigerado (Jay, 2000)

1989 (Florida) se detectaron que aprox. 19,000 sandwich estaban contaminados con *Listeria monocytogenes*, tras evaluar la planta procesadora encontraron condiciones insanas, (pisos sucios agua estancada, condensaciones en techo y paredes y utensilios sucios empleados en la fabricación del producto) (Dale, 1990)

1989 (Texas) listeriosis en un paciente con cáncer que consumió una salchicha estilo frankfurt de carne de pavo contaminada fueron determinantes para que en E.U. se determinara la "cero tolerancia" a listeria en los productos listos para consumirse (Dale, 1990)

1990 Se presentaron muchas enfermedades causadas por bacterias patógenas, uso de antibióticos y hormonas en Europa. (Dimara, 1995). Las regulaciones (General Food Hygiene) se centraron en el envenamiento asociados a productos vegetales y quesos por *Listeria monocytogenes*. (Adams, 1995)

1992 (Francia) 279 casos por contaminación con *L. monocytogenes* por consumo de lengua de cerdo (Sharp, 1994)

1994 (E.U) El consumo de alimentos preparados ha incrementado la venta de estos productos en los supermercados, se realizó un estudio con ensaladas. De un total de 87 ensaladas, se logro aislar en 2 la *Listeria monocytogenes*. La relación intrínseca con otras bacterias, en el mayor de los casos previene el crecimiento de las bacterias patógenas. (Hunter, 1994)

1999 el CDC (Centers for disease control and prevention) reportó que de todos los patógenos transmitidos por alimentos en E.U, la *Listeria monocytogenes* es la segunda causa de muerte en un 20% y el numero de hospitalizaciones es de 90%. Se estima que cada año se presentan 2500 casos de listeriosis, incluyendo aprox. 500 muertes. (Gallegher, 2003)

1999 (E.U) importante contaminación con *L. monocytogenes* asociado a hot dogs y productos lácteos. 100 casos, 21 muertes. (Gallegher, 2003)

2001 FDA evaluó 20 categorías de alimentos y concluyo que en los productos lácteos esta la mas alta incidencia de enfermedades y muertes por *L. monocytogenes*, mientras que los embutidos ocupan en segundo en incidencias. (Gallegher, 2003)

2002 (E.U.) Brote en múltiples estados en el Noreste de Estados Unidos, 130 casos, 27 muertes. La fuente de contaminación: pechugas de pavo y de pollo. Se retiraron 200 000 libras de producto del mercado

2002 (E.U.) Brote en ocho estados de EU. 50 casos, 10 muertes (incluyendo tres abortos espontáneos o muertes prematuras) por *Listeria monocytogenes* Fuente: Pavo precocido para rebanar tipo deli. Volumen de retiro: 27.4 millones de libras de pavo, pollo fresco y congelado (Wampler)

2003 (Trinidad) se realizó una investigación debido a la contaminación con *Listeria monocytogenes*. La investigación condujo a determinar las posibles causas de esta contaminación. Los resultados demostraron que la planta se encontraba cerca de un tiradero de desperdicios fecales, provocando que aire arrastrara esta contaminación hasta la planta, se encontró falta de higiene y Sanitización de los áreas de trabajo. Después de 4 meses fue recomendada la implantación de un programa de limpieza, Sanitización y buenas prácticas en

la planta antes y después de procesar materias crudas en donde la reducción de este patógeno fue notable. Mas sin embargo no se logro la reducción total del mismo. (Gibbons, 2006)

En los últimos años se ha resaltado las enfermedades en humanos a través de verduras y frutas crudas, enfermedades causadas por bacterias patógenas, parásitos o virus. (Beuchat, 2006)

Debido ala problemática social que ha generado las enfermedades a causa de la *Listeria monocytogenes* la FDA ha puesto de manifiesto la importancia de eliminar este patógeno, entre los reclamos reportados se encuentran los siguientes:

- Alabama, Illinois, Indiana, Kentucky, Mississippi, Tennessee. Ensaladas y quesos. Productos contaminados con *Listeria monocytogenes*. Empresa: Mrs. Grissom's Salads, Inc

- California, Colorado, Florida, Georgia, Illinois, Kansas, Maryland, Maine, Michigan, North Carolina, Nevada, Oklahoma, Oregon, Pennsylvania, Texas, UTA, 309 casos contaminación listeria monocytogenes en mejillones. Empresa: Kiwi Mussels Ltd.

- Florida., Productos pesqueros, 120 libras contaminadas con listeria monocytogenes. Empresa: NTT Seafood, Inc.

- Este E.U, Massachusetts, Connecticut, New York, New Jersey, Ohio, Florida. 624 libras contaminadas con *L. monocytogenes* por consumo de queso. Empresa: Springfield Smoked Fish Company

- Massachusetts, 50 272 casos de enfermedades producidas por alimentos con *L. monocytogenes* por consumo de camarones. Empresa: New England Shrimp Company

- New York. 189 libras de pescado contaminado con *L. monocytogenes*. Empresa: Blue Ribbon Smoked Fish Company

- Missouri, Kansas, Iowa, Oklahoma, Illinois, Georgia, 8,290 sandwiches de jamón y pavo contaminados con *L. monocytogenes*. Empresa: Quik'n Tasty Foods

- Ohio, 229 casos de contaminación con *Listeria monocytogenes* por consumo de pollo frito. Empresa: Worthington Foods (FDA, 1993)

## 1.2 Morfología y Fisiología

El género *Listeria* comprende en la actualidad seis especies divididas en líneas de descendencia: *L. monocytogenes* y las especies emparentadas cercanamente *L. innocua*, *L. ivanovii* (subespecie *ivanovii* y subespecie *londoniensis*), *L. welshimeri* y *L. seeligeri* y *L. grayi* (*L. murray*). Solo son consideradas virulentas las especies *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (Adams, 2001)

*Listeria monocytogenes* es un microorganismo de tamaño variable, de 0,4 a 0,5 por 1.0 a 2.0  $\mu$ . Las células son cocobacilares, en ocasiones diplobacilares con tendencia a formar cadenas de 3 a 5 o más células. (Macias, 1992). Suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas, en cultivos viejos pueden aparecer formando filamentos de 6-20 mm de longitud presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28°C pueden aparecer formando filamentos de 6-20mm de longitud (Seimc, 1995)

Es un bacilo corto, Gram positivo, no esporulado, móvil, aerobio, capaz de crecer en condiciones de microaerofilia, catalasa positivo y oxidasa negativo. En agar sangre da origen a colonias puntiformes, circulares, lisas y translucidas de color azul grisáceo con una zona discreta de b-hemólisis (NOM-143-SSA1-1995). Las colonias son pequeñas de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas.

Al observarse a la lupa con epiiluminación, con un ángulo de la luz de 45°-60°, se observan reflejos de color azul-verdoso sobre una superficie finamente granular (Seimc, 1995) Crece a temperaturas de -2° C a 50° C, es resistente a la presión osmótica (Mastronicolis, 2006, Doyle, 2001) en un rango de crecimiento a pH: 4.4-9.4, Min. Disp. Aw 0.92 (Cortez, 2006)

Es Dextrosa (+), Esculina (+), Maltosa (+), Ramnosa (+), Xilosa (-), Manitol (-), Hidrólisis de hipurato (+), Voges Proskauer (+), Rojo de metilo (+), Beta-hemolisis (+), Reducción de nitrato (-), Hidrólisis de Urea(-), Catalasa (+), H<sub>2</sub>S con TSI (-), CAMP positiva/*S.aureus* (+), CAPM postiva/R. equi (-) (Doyle, 2001, Jay, 2000, Jay,1996) Todas las listerias producen ácido pero no gas de la dextrosa, esculina o maltosa. *L. monocytogenes* produce ácido pero no gas de la raminosa. (Doyle, 2001)

La presencia de un 10% de sal o cuando la actividad acuosa ( $a_w$ ) es menor a 0.92 provoca una alta resistencia a la destrucción por temperatura (van Asselt, 2005). Este efecto

es causado por una protección cruzada (Varman, 1991) la composición de la membrana de esta bacteria favorece su crecimiento a las temperaturas de refrigeración (aprox. 20% de hexosa (glucosa y galactosa), 5% de proteína alanina, ácido glutámico, ácido diaminopimérico, ácido aspártico y leucina (Mastronicolis, 2006). Crece en condiciones bajas de oxígeno, a temperaturas de refrigeración y sobrevive por largos periodos. (Gallegher, 2003), Tiene la capacidad de formar películas en varias zonas de producción de los alimentos, principalmente es zonas húmedas, haciendo mas difícil su eliminación (Duggan, 1998)

Existen, mínimo 16 serovariedades de *Listeria monocytogenes* identificadas por un agrupamiento serológico de los cinco antígenos flagelares termolábiles y los catorce antígenos termoestables conteniendo carbohidratos. Solo tres serotipos -1/2a, 1/2b y 4b son responsables de más del 90% de la enfermedad en humanos (Macias, 1992, Jay, 2000, Jay, 1996)



### **1.3 Pruebas de identificación**

#### ***Identificación de género.***

La observación en la tinción de Gram de una colonia de bacilos gram-positivos que sean catalasa positivos, produzcan ácido de la D-glucosa, hidrolicen la esculina, den positivas las reacciones de Voges-Proskauer y del rojo metilo y sean móviles, debe hacernos pensar que nos encontramos ante una bacteria perteneciente al género *Listeria*.

Debido a que comparte algunas características con otros géneros bacterianos gram-positivos, se debe establecer el diagnóstico diferencial con algunos de ellos. Del género *Streptococcus* puede diferenciarse por la tinción de Gram (bacilo gram-positivo), la movilidad (móvil), la prueba de la catalasa (positiva) y la sensibilidad a la gentamicina. De *Erysipelothrix rhusiopathiae* puede diferenciarse por el crecimiento a 4°C, la prueba de la catalasa (positiva), la movilidad (móvil) y la sensibilidad a la vancomicina. De las corinebacterias móviles, por la hidrólisis de la urea (negativa), la reacción de Voges-Proskauer (positiva) y por la producción de ácido de la D-glucosa en condiciones estrictamente aerobias (positiva).

### **Identificación de especie.**

La identificación de especie es importante ya que todos los miembros del género *Listeria* son capaces de contaminar alimentos pero sólo *L. monocytogenes* produce patología en humanos. Dicha identificación se realiza mediante unas pocas reacciones bioquímicas y la capacidad de producir hemólisis, característica esencial para distinguir *L. monocytogenes* de *L. innocua*, que es la especie no patógena aislada con más frecuencia.

Sólo tres especies son hemolíticas, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii*. Las dos primeras producen una estrecha zona de hemólisis, a veces limitada al diámetro de la colonia; *L. ivanovii* muestra una hemólisis amplia. La prueba de CAMP es positiva para *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* en la proximidad de una estría de *Staphylococcus aureus*, mientras que *L. ivanovii* sólo da positiva la prueba de CAMP en presencia de una estría de *Rhodococcus equi*.

En cuanto a la producción de ácido de los carbohidratos, *L. monocytogenes* presenta un perfil D-xylosa negativa y a-metil D-manósido positivo que la distingue de las otras especies hemolíticas. Existen pruebas bioquímicas miniaturizadas en una galería específicamente creada para este género, el API *Listeria* (bioMérieux, Francia). También está disponible una sonda de DNA para la identificación rápida de *L. monocytogenes* a partir de colonias cuyo revelado se basa en una técnica de quimioluminiscencia.

### **Métodos alternativos**

El desarrollo de los métodos convencionales ha explotado las características de *Listeria spp.*, utilizando los enfoques microbiológicos tradicionales que se basan en el conocimiento de los requerimientos de crecimiento del microorganismo y las características bioquímicas conocidas. Estos métodos son, sin embargo, muy laboriosos y prolongados, obteniéndose los resultados negativos tras 3 ó 4 días. Si las colonias presentes en un agar selectivo exhiben las características morfológicas típicas de *Listeria spp.*, son necesarios de 2 a 7 días más para confirmar estas colonias sospechosas como *Listeria spp.* e identificar que especie está presente. Por consiguiente, existe la necesidad de suplir los métodos convencionales con métodos más simples y menos laboriosos, que sean capaces de dar los resultados mucho más rápidamente que los métodos convencionales.

Actualmente existen una gran variedad de métodos alternativos para la detección e identificación de *Listeria spp.* y la lista crece rápidamente ya que las nuevas tecnologías están explotadas para su aplicación según las necesidades de los microbiólogos. Algunos de los métodos se citan a continuación:

#### **Kits de identificación bioquímica**

Son unas de las formas más simples de los sistemas de ensayo para la identificación de *Listeria monocytógenes* que ahorran trabajo. Consisten en una batería de reacciones bioquímicas que tienen lugar en cámaras ya formadas, suministradas en una unidad desechable. Normalmente, tras la incubación, las reacciones se comprueban mediante un cambio concreto de color en el medio. Tras la verificación, se obtiene un perfil del microorganismo, que se utiliza para determinar la identidad de las especies de *Listeria*. Para una identificación de *L. monocytógenes*, puede ser necesario completar los resultados obtenidos con un test de CAMP y de hemólisis por separado. También se encuentran disponibles algunos kits específicos de reacciones enzimáticas que pueden ser utilizados para diferenciar de forma rápida las colonias de *Listeria spp.* de otras colonias de microorganismos que son esculina positivos en agar Oxford. (Bell, 2000)

#### **Ensayo inmunosorbente con enzima ligado (ELISA)**

Los test ELISA hacen uso de la alta especificidad que un anticuerpo presenta sobre su antígeno diana; en este caso, *Listeria spp.* Los anticuerpos anti-*Listeria* están unidos a un sustrato sólido, por ejemplo, la superficie interna de los pocillos de una placa <microtitre>, y se utilizan para capturar a los antígenos de *Listeria* presentes en el caldo de enriquecimiento que se coloca en el pocillo. Tras una secuencia de manipulaciones que incluyen lavados, la adición de otros reactivos e incubaciones, se obtiene un producto final coloreado en aquellos pocillos que contienen *Listeria*. Es necesario un enriquecimiento de la muestra mediante el uso de caldos de enriquecimiento convencionales para asegurarse que se encuentran disponibles un número suficiente de células diana ( $10^5 - 10^6$  por ml) para la detección de una muestra positiva. Normalmente, los resultados positivos obtenidos mediante ELISA son confirmados por la siembra en estría del caldo de enriquecimiento original sobre un agar selectivo y siguiendo después el método convencional para identificar a las especies de *Listeria* presentes.

Este método puede proporcionar una exploración rápida de las muestras, disponiendo de un resultado negativo en 48 h y de una indicación temprana potencial de un resultado positivo. (Bell, 2000)

### **Separación inmunomagnética**

Esta técnica se utiliza para mejorar la sensibilidad y especificidad de los métodos selectivos convencionales para la detección de la presencia de *Listeria spp.* en las muestras. Emplea pequeñas perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos frente a *Listeria*. Las propiedades magnéticas de las perlas se utilizan para separar las células del caldo, éstas son sembradas en un agar selectivo y se sigue después el método convencional para identificar cualquier *Listeria spp.* aislada. En otra aplicación de la técnica, de uso todavía no muy extendido, las perlas se utilizan para capturar y concentrar a *Listeria spp.* directamente a partir de la suspensión de la muestra. Entonces se retiran las perlas y se transfieren directamente a la superficie de una placa de agar selectivo. Se incuban las placas para producir microcolonias, las cuales a su vez se retiran mediante una impronta con una membrana, para su examen mediante técnicas cromogénicas para el recuento de las colonias positivas a *Listeria spp.* (Unicordoba, 2007)

### **Test de inmunocromatografía y aglutinación en látex**

Los anticuerpos frente a antígenos flagelares de *Listeria* se inmovilizan en línea sobre una membrana. El caldo de enriquecimiento ya crecido recibe un tratamiento térmico antes de ser expuesto a partículas de látex unidas a anticuerpos específicos frente a *Listeria* dispersas en la base de la membrana. Si se encuentran presentes antígenos de *Listeria*, las partículas de látex se unen a ellos mediante los anticuerpos específicos y se aproximan a la membrana. Los anticuerpos inmovilizados en la membrana capturan el complejo *Listeria*-anticuerpo-látex y al ir concentrándose las partículas de látex, se forma una línea de color que indica un resultado positivo.

También pueden utilizarse tests de aglutinación con perlas de látex recubiertas de anticuerpos para detectar *Listeria spp.* directamente a partir del cultivo en el caldo de enriquecimiento, aunque se utilizan más comúnmente para explorar colonias presuntivas de *Listeria* en agares selectivos ya que son necesarios altos niveles antes de que la agregación de las partículas de látex sea visible.

Estos métodos ofrecen especificidad y ahorro de tiempo; sin embargo debido a las potenciales reacciones de falsos positivos, la presencia de *Listeria spp.* se confirma normalmente la siembra en estría a partir del caldo de enriquecimiento original sobre un agar selectivo y siguiendo después los métodos convencionales para su identificación. (Berrada, 2006)

### **Sondas genéticas**

Consisten en secuencias de DNA producidas sintéticamente que son complementarias a secuencias de DNA o RNA específicas de los microorganismos diana: tanto las especies del género *Listeria* como *L. monocytógenes*.

Las sondas genéticas se aplican normalmente a las colonias cultivadas en medios específicos selectivos o agar nutritivo. Pueden aplicarse directamente a los caldos tras un periodo de incubación de 48 h, pero este método podría dar falsos negativos si las células de

*Listeria* no han alcanzado una concentración suficientemente elevada (  $10^6$  por ml) para dar una reacción positiva.

La alta especificidad de estas pruebas tiene como consecuencia que una vez que se obtiene un resultado no es necesario ningún test confirmatorio a menos que se necesite información concreta de la identificación genética de la colonia aislada. (Berrada, 2006)

### **Técnicas eléctricas**

Se basan en la capacidad de los instrumentos de controlar y detectar pequeños cambios en las propiedades eléctricas de un medio en el cual está creciendo un microorganismo. Se han desarrollado caldos específicos que favorecen el crecimiento de *Listeria spp.* Al crecer el microorganismo, se utilizan sustratos concretos del caldo, dando lugar a productos del metabolismo que producen cambios detectables en la conductancia. Estas variaciones son registradas como una curva de conductancia. La curva generada es controlada mediante ordenador; si se ajusta a ciertos criterios prefijados, se registra la muestra como positiva y el caldo se considera presuntamente positivo del género *Listeria*. La confirmación de cualquier caldo presuntamente positivo se realiza mediante la siembra en estría a partir del caldo en un agar selectivo y siguiendo después los métodos convencionales para identificar a *Listeria spp.* presente. (Bell, 2000)

### **Métodos de fingerprinting o de identificación genética**

*Ribotipado*: consiste en someter a hibridación el ADN genómico de una bacteria digerido con una enzima de restricción y transferido a una membrana contra una sonda que sea complementaria a la secuencia de ADN de los genes del ARNr. Actualmente las sondas más utilizadas son de ADN, estas pueden ser ADN cromosómico sintetizado directamente de rARN mediante transcripción reversa.

*Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)*: Técnica que permite obtener patrones de los fragmentos de restricción cromosómicos. se basa en que primero es aplicado un campo eléctrico (E1) al gel, entonces hebras de ADN, el cual se ha cortado con enzimas de

restricción, éstas se elongan en la dirección del campo eléctrico y comienzan a migrar en el gel, por los cambios periódicos en el campo eléctrico. Este primer campo es entonces removido y un segundo campo (E2) en ángulo con el primer campo, es activado. El ADN debe cambiar la conformación y la reorientación antes de comenzar a migrar en la dirección del segundo campo eléctrico. El tiempo requerido para esta reorientación varía de acuerdo al peso molecular de la muestra. La PFGE separa fragmentos

cromosómicos que no pueden ser separados por el método convencional uni-direccional de electroforesis. El límite de la electroforesis convencional es su ineficiencia para separar secuencias

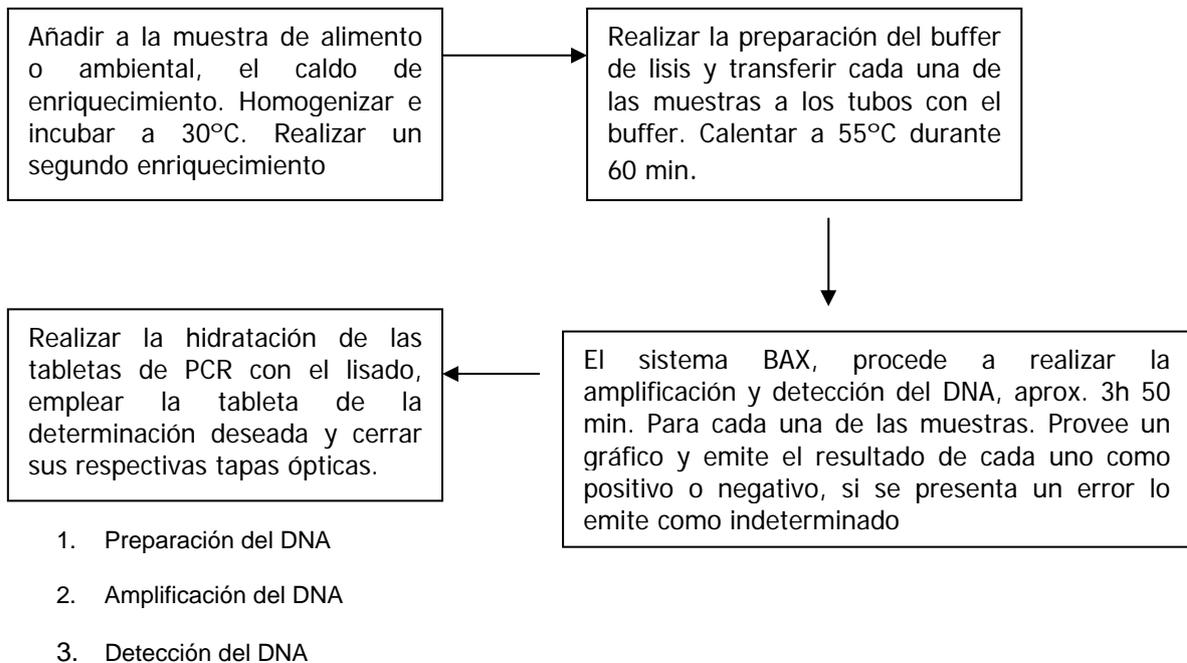
de ADN con un tamaño mayor de 50kb. Las técnicas moleculares para el análisis de ADN cromosomal como el PFGE han demostrado ser un método eficiente para resolver divergencias entre las diferentes cepas y ha sido bastante utilizado en el estudio epidemiológico de las mismas. (Unicordoba, 2007)

*DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD)*. (Modificación de PCR que permite una amplificación al azar de segmentos desconocidos de DNA utilizando un único oligonucleótido iniciador. Se obtienen un número de fragmentos, cuyos tamaños y distribución se utilizan para comparar colonias aisladas.) (Bell, 2000)

*Electroforesis de enzima multilocus (MLEE)*: método utilizado para distinguir entre aislados de la misma especie en base a patrones de migración de las enzimas solubles en agua, obtenidos mediante electroforesis de los extractos celulares. Es un método genético indirecto, que analiza la movilidad electroforética de un número concreto, generalmente entre 15 y 20 enzimas metabólicas en geles de almidón o poliacrilamida. Las variaciones observadas en estas movilidades corresponden con variaciones en el locus o gen codificante de cada enzima. Por lo tanto, cada variante se define como "variante alélica" y los diferentes alelos de cada uno de los genes conforman el perfil alélico que a su vez define el tipo electroforético. (Doyma, 2007, Seimc, 1995)

El método rápido BAX es un ejemplo de técnica por PCR en donde el tiempo estimado de identificación es de 3 días. Usado en el Instituto de Investigación de AOAC, Validado por AFNOR y Aprobado por Health, Canadá; este quipo permite analizar diferentes

alimentos: frescos, especies, carne, frutas/vegetales/ensaladas, productos del mar, granos, chocolate, etc.



#### 1.4 Sobrevivencia

Se ha tratado de estudiar la habilidad de sobrevivencia al tratamiento térmico, principalmente en productos lácteos, en donde la leche es un medio idóneo para el crecimiento de la bacteria. Algunos reportes indican que pasteurización HTST (71.7° C a 15s) no es adecuada para la inactivación de un numero elevado de células de *L. monocytogenes*. En escalas comerciales las pasteurizadoras trabajan a 72° C a 16s, en donde se ha trabajado con leche cruda con 10<sup>4</sup> organismos/mL se ha demostrado que no hay sobrevivencia de la bacteria en estas condiciones.

*L. monocytogenes* puede sobrevivir a 37° C por 15 días a 10.5% de NaCl, 10 días a 13% de NaCl, 5 días a una concentración de 20 a 30% de NaCl. Cuando la temperatura disminuye a 22° C la sobrevivencia aumenta el doble de tiempo. A 4° C *L. monocytogenes* puede vivir por 100 días a 10.5- 30% de NaCl. Algunos reportes indican que puede crecer a 10% de NaCl y sobrevivir por un año manteniendo un 16% de NaCl a un pH de 6.0

Este microorganismo puede sobrevivir de 3 a 6 meses en paja seca y sobrevivir en eses fecales secas y en tierra por mas de 2 años (Doyle, 2001)

Estudios revelan la sobrevivencia de la *Listeria monocytogenes* en leche cruda, en donde se muestra que la bacteria puede permanecer viable por hasta por 8-9 almacenada a 5° C (Ryser, 1999)

## CAPITULO II. PAPEL PATÓGENO

*Listeria monocytogenes* es una bacteria patógena oportunista que afecta principalmente a mujeres embarazadas, gente mayor y a recién nacidos, causa septicemia, abortos y puede causar la muerte (Mead, 1994), pudiendo sobrevivir por largos periodos de tiempo en productos cárnicos y lácteos. (Teixeira, 2005)

Se han reportado 2500 casos incluyendo 500 muertes anualmente en E.U con un costo estimado de 2.33 billones de dólares. Siendo la listeria la mas cara en su tratamiento (Kornack, 2005)

La incidencia anual por 100.000 habitantes puede variar del 0,3 al 0,8% y alcanzar un 5% durante algunos brotes epidémicos (Seimc, 1995)

Si bien, la enfermedad es rara por ejemplo, en E.U se presentan 1 a 9 casos de listeriosis por millón de habitantes por año y representan el 0.02% de las enfermedades que se transmiten por los alimentos. Entre 1996 y 2001 se presentaron entre 3 a 5 casos por 1.000.000 habitantes/año. La complicación reside en que entre el 20 y 30% de los casos de listeriosis de origen alimentaria da lugar a defunciones. (Griffith, 1995)

El 99% de los casos es de origen alimentario; el resto obedece a la infección de los neonatos por una madre infectada o por contagio en salas de neonatología. (FAO, 2006)

### 2.1 Listerosis

Cuando la *L. monocytogenes* se adquiere por vía oral, parece ser que coloniza el tracto intestinal mediante mecanismos poco conocidos, desde el tracto intestinal, el microorganismo invade los tejidos, incluida la placenta de las mujeres gestantes, y pasa a la corriente sanguínea desde la que alcanza otras células sensibles del organismo. Como patógeno intracelular, primero debe penetrar en las células sensibles y después ser capaz de replicarse en el interior de estas células. En el caso de los fagositos, la penetración tiene lugar en dos fases: directamente a los fagosomas, y de los fagosomas al citoplasma de los fagositos, penetración favorecida por una proteína extracelular distinta, denominada p60.

El nombre de monocytogenes proviene después de que se demostró que los extractos fenólico-acuosos de células de *L. monocytogenes* inducían la producción de monocitos, y de aquí que debido a este agente de la actividad productora de monocitosis (MPA) (Jay,2000)

### **Mecanismo de patogenicidad**

Han sido utilizadas varias pruebas, que incluyen análisis en tejidos tisulares y pruebas que utilizan animales de laboratorio, concretamente ratones, que están inmunocomprendidos.

*L. monocytógenes* atraviesa la barrera intestinal, las bacterias son interiorizadas por macrófagos en los cuales son capaces de sobrevivir y multiplicarse. Posteriormente son transportadas por la sangre a los ganglios linfáticos regionales. Cuando llegan al hígado y al bazo, la mayoría de las *listerias* son destruidas rápidamente. En la fase inicial de la infección, los hepatocitos infectados son el blanco de los neutrófilos y más tarde de los fagocitos mononucleares, que son responsables del control y resolución de la infección. Dependiendo del nivel de la respuesta de las células T inducida en los primeros días de la infección, posteriormente puede ocurrir una diseminación más remota por medio de la sangre al cerebro o, en la hembra animal gestante, posteriormente el organismo se puede encontrar en la placenta. Por consiguiente, la infección no está localizada en el sitio de entrada sino que implica la entrada y multiplicación en una gran variedad de tipos de células y tejidos. El principal sitio de infección es el hígado. *In vitro*, *L. monocytogenes* invade varias líneas celulares de tipos diferentes (macrófagos, fibroblastos, hepatocitos y células epiteliales).

*L. monocytogenes* entra mediante fagocitosis tanto en las células fagocíticas como en los fagocitos no especializados. Este primer paso en la infección se previene mediante adición de citocalasina D, un agente que inhibe la polimerización de la actina y por lo tanto la participación activa de las células de mamífero. En el caso de las células fagocíticas no especializadas, el proceso es desencadenado por la bacteria y por esta razón es denominada fagocitosis inducida. Inmediatamente después de la entrada, las bacterias son interiorizadas en vacuolas unidas a la membrana, que son lisadas en menos de 30 minutos. Las bacterias intracelulares quedan libres en el citosol y comienzan a multiplicarse con un tiempo de duplicación de aproximadamente de 1 hora. Estas bacterias intracitoplásmicas se recubren de una nube de filamentos de actina celular que después se refunde en una cola de cometa

polarizada de una longitud de hasta 40  $\mu\text{m}$ . La cola de actina del cometa está constituida por microfilamentos de actina que se congregan continuamente en la proximidad de la bacteria y después quedan libres y se entrelazan. La cola de actina del cometa está fija en el citosol y queda por detrás al desplazarse la bacteria. Cuando las bacterias llegan a la membrana plasmática, emiten protuberancias de gran tamaño, cada una con una bacteria en su extremo. Después, estas protuberancias son interiorizadas por una célula vecina, originando una vacuola rodeada por una membrana doble. Después de la lisis de esta vacuola, comienza un nuevo ciclo de replicación, desplazamiento y propagación de las bacterias. (Doyle, 2001)

A pesar de la amplia presencia de la bacteria en el ambiente la enfermedad no es frecuente. La listeriosis es considerada una infección oportunista; es decir, se presenta en individuos vulnerables. Presenta dos tipos de cuadros:

**1. *Invasivo***

**2. *Gastroentérico***

El cuadro mas severo, presenta severas manifestaciones invasivas que dan lugar a meningitis con o sin septicemia, ó sólo septicemia. Las manifestaciones usuales son: septicemia, meningitis, conjuntivitis, encefalitis, endocarditis, partos prematuros, abortos, nacidos muertos. La enfermedad tiene un 20% de letalidad. El período de incubación es de 7 a 30 días y el 85 a 90% requiere hospitalización.

Por otro lado, el cuadro gastroentérico puede presentar desde portadores sin síntomas hasta individuos con signos gastrointestinales.

Los grupos vulnerables son individuos inmunocomprometidos, embarazadas, neonatos y fetos, enfermos crónicos y gerontes. (FAO, 2006)

Listeriosis es uno de los principales causas de muerte (aprox 20%) en poblaciones susceptibles, pudiendo resultar en septicemia, meningitis, abortos. (Powell, 2006)

El periodo de incubación después de tener la enfermedad es de diez semanas, dificultando su diagnóstico. (Berrada, 2006). Algunos autores reportan que la Identificación de

síntomas se puede llevar a cabo en un lapso de 2 a 6 semanas después del consumo del alimento (Kornack, 2005)

Durante la etapa de embarazo se deben tener consideraciones especiales para evitar contraer listeriosis y toxoplasmosis, las cuales producen severos efectos en el recién nacido (migrañas, deformidades o la muerte). Se debe evitar comer quesos de pasta suave como Camembert, Brie y Cambozola, quesos azules: Stilton, Danish, Roquefort, Dolcelatte; Paté y comida rápida que haya sido congelada. (Dimond, 1994)

### **Sensibilidad a antibióticos**

El patrón de sensibilidad a los antibióticos de *L. monocytogenes* ha permanecido relativamente estable con el paso de los años. Generalmente, este microorganismo es sensible a una amplia gama de antibióticos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicina, cotrimoxazol y vancomicina. (Oliver, 1990) Presentan una pobre actividad las fluorquinolonas actuales y las cefalosporinas, especialmente las de tercera y cuarta generación como cefotaxima y cefepima. Casi todas las cepas son resistentes a fosfomicina. Se han descrito resistencias a macrólidos y a tetraciclinas en algunos aislamientos; suelen estar codificadas por plásmidos, aunque también hay casos de resistencia a tetraciclinas codificada por el cromosoma. (Poyart-Salmeron, 1990) rifampicina tiene muy buena actividad in vitro pero se seleccionan cepas resistentes durante el tratamiento con mucha facilidad. Existe un caso de resistencia a trimetoprim en una cepa de *L. monocytogenes*, por un mecanismo desconocido hasta ahora. Aunque se han descrito fracasos clínicos en tratamientos con penicilina o ampicilina, no se ha encontrado ninguna cepa resistente a estos antibióticos.

La mayor parte de los antibióticos se muestran bacteriostáticos frente a *L. monocytogenes*. En particular los b-lactámicos tienen un gran intervalo entre la CMI y la CMB. Sólo se ha observado actividad bactericida en los aminoglucósidos, glucopéptidos y cotrimoxazol (principalmente asociada al trimetoprim)

La Vacuna IL-12 podría ser una estrategia efectiva contra agentes potenciales. Desafortunadamente el uso de IL-12 es limitado por su inestabilidad a la temperatura del ambiente, costo de producción y a la toxicidad cuando se usa en grandes dosis (Klas, 2006)

## **Tratamiento**

Al ser la listeriosis una enfermedad relativamente rara en humanos, no hay estudios prospectivos y controlados que establezcan el mejor tratamiento antibiótico. Actualmente se considera que las mejores opciones son la penicilina o la ampicilina, solas o asociadas a gentamicina. Se han descrito fallos terapéuticos con estos antibióticos, pero nunca se ha demostrado *in vitro* resistencia al compuesto b-lactámico utilizado. En el manejo de estas infecciones son de gran importancia el empleo de dosis altas y la duración adecuada del tratamiento, que deben individualizarse. Estudios *in vitro* han demostrado sinergia de ampicilina y penicilina con aminoglucósidos. Esta asociación debe utilizarse en casos de *granulomatosis infantiseptica* o de sepsis neonatal. En aquellos pacientes con meningoencefalitis pueden asociarse aminoglucósidos, administrados por vía intratecal, al tratamiento base de penicilina o ampicilina.

La combinación de trimetoprim y sulfametoxazol se ha utilizado con éxito en pacientes alérgicos a penicilinas, considerándose en la actualidad la terapia alternativa en esta circunstancia.

La duración apropiada del tratamiento tampoco está clara. Tras dos semanas de terapia se han descrito recurrencias en pacientes inmunodeprimidos parece conveniente, por tanto, prolongar la terapia entre tres y seis meses en estos casos. En general dos semanas parecen ser suficientes en bacteriemias mientras que en meningitis se deberían utilizar ciclos más largos (Seine, 2005)

## **2.2 Repercusiones económicas y en la salud**

Las enfermedades causadas por riesgos microbiológicos en un problema público en Europa, que ha aumentado en estos años, estudios han estimado que alrededor de un 50 a 87 por ciento han reportado enfermedades transmitidas por alimentos asociados al hogar (Clayton, 2003)

OMS ha reportado que las enfermedades transmitidas por alimentos son de 300 a 350 veces mas frecuentes de lo indicado en reportes anteriores, entre los principales patógenos involucrados se encuentran *Escherichia coli* o157:H7, ***Listeria monocytogenes*** y *Salmonella spp.* que junto con *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Toxoplasma* son causante de 3,3 a 12,3 millones de casos en EU y de alrededor de 3900 muertes. A esto se suman los altos costos para el sector de salud, que ascienden los treinta mil millones de dólares al año. (Reuben, 2003)

Se estima que cada año cerca de 1.3 millones de casos de enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos en Inglaterra y Gales. La mayoría de estos casos listeriosis causante de muertes causando grandes pérdidas económicas. (Breen,2006)

1997 Codex Alimentarius indica que las enfermedades de transmisión alimentaria y los daños provocados por los alimentos son, en el mejor de los casos desagradables, y en el peor de los casos pueden ser fatales. El deterioro de los alimentos ocasiona pérdidas, es costoso y puede influir negativamente en el comercio y la confianza de los consumidores. Por consiguiente, es imprescindible un control eficaz de higiene, a fin de evitar los daños ocasionados por los alimentos y por el deterioro de los mismos, para la salud y la economía. Todos, fabricantes, elaboradores, manipuladores y consumidores de alimentos sean incluidos y aptos para el consumo. La responsabilidad del control de los riesgos microbiológicos recae sobre los individuos que intervienen en todas las fases de la cadena alimenticia, desde la explotación agrícola o ganadera hasta el consumidor final. (Matos, 2005, Chils, 1997)

FSIS reporta que en 1999 se presentaron 2493 enfermedades causadas con *L. monocytogenes*, de las cuales 2298 requirieron hospitalización y 499 muertes en E.U (FSIS 2000)

### CAPITULO III. INCIDENCIA EN ALIMENTOS

Se ha aislado a esta bacteria de gran variedad de animales: ovejas vacas, cerdos, caballos, patos, conejos, perros, gatos, ratones, cabras. Se estima que se presentan 1,600 casos de listeriosis al año en Estados Unidos. Reconociendo esta enfermedad como un serio problema transmitido por alimentos debido al alto numero de mortalidad. (Doyle, 2001)

De gran importancia entre los patógenos asociados a los alimentos porque se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y ha sido aislada de muchas especies de animales y diferentes alimentos. Se han descrito brotes asociados a ensalada de pollo, pavo (FSIS, 2002), carnes frías, quesos no pasteurizados, leche pasteurizada, helados (Pawsey, 2001) y otros productos lácteos, básicamente en la elaboración de quesos artesanales. (Reuben, 2003, Cortez, 2006, Dale, 1990, Erkiew, 2000, Hilton, 2002, Kupiec, 1998, Ryser, 1999). Huevo, mayonesa, arroz (Sharp, 1994)

Con frecuencia está presente en productos crudos (carne, aves, pescado, frutas y vegetales frescos: col, apio, lechuga y tomates. (Beuchat 2006, Gallegher, 2003); agua, tierra, vegetación, eses fecales humanas y animales, ensaladas, quesos, pateé, embutidos, pescado (Doyle, 2001). En el procesamiento de la comida rápida, quesos, helados, productos cárnicos (Berrada, 2006, Dimara, 2005)

Es importante destacar la frecuencia en los alimentos listos para consumirse (Meldrum, 2006, Sommers, 2005, FSIS, 1999, FSIS, 2000, FSIS, 2003)

*Listeria monocytogenes* crece en competencia con la microflora natural del pescado 5°C, pH 6.8, 43% CO<sub>2</sub>, 57%N<sub>2</sub> (Powell, 2006) la actividad depende del almacenamiento, manejo y procesamiento del material crudo. La disminución de la temperatura, enlatado, empaque en atmósferas modificadas, irradiación favorecen la calidad y inocuidad en productos marinos (Fraser, 1998)

CDS considera que las enfermedades por *Listeria* se deben principalmente por el consumo de alimentos de origen animal crudos, por una contaminación cruzada en el procesamiento de alimentos. (Caskie, 2001, Berrada, 2006, CDS, 2005), la contaminación ocurre durante la preparación o después de esta favoreciendo el crecimiento del patógeno causante principal de la infección o intoxicación. (Beuchat, 2006)

El uso de fertilizantes, compuestas, aguas residuales, fango proporcionan nutrientes que aumentan el crecimiento de los microorganismos; las enfermedades resultan de la deficiencia en eliminar estas bacterias antes de su consumo. (Beuchat, 2006, CDS, 2005)

Algunos de los datos de incidencia en alimentos se reportan en la siguiente tabla:

**Tabla #1 Incidencia en alimentos y su procedencia**

ALIMENTO	INCIDENCIA/Aislamientos	PROCEDENCIA
Leche cruda	1% de 1004 45.3% de 95 4.4% de 137 5.4% de 315 12% de 121 4% de 200 4.2% de 350	Alemania España Holanda Ontario E.U Nebraska E.U
Helados	0.4% de 530	Canadá
Quesos	10% de 222 14,5% de 69	Gran Bretaña Francia
Carne de cerdo	58.5% de 34 95% de 19 80% de 30	Taiwan Canadá Alemania
Carne de vaca y cerdo	36% de 100  44% de 117	Austria Alemania
Carne de vaca	49% de 41 24% de 25 26.2% de 149 28% de 67	Maryland Taiwan Francia Dinamarca
Alimentos marinos	10.5% de 57	Taiwan
Pollo crudo	50% de 16 47% de 17 57% de 35 33% de 22	Taiwan Dinamarca Reino Unido Maryland
Pollo asado	23% de 90	E.U.
Pollo congelado	60% de 100	Reino Unido
Pavo	38% de 50 15% de 180	Taiwan California
Huevo	5% de 42	E.U.
Embutidos	21.6% de 37 15.6% de 96 59% de 30	Francia Canadá Alemania
Ensaladas frescas	7% de 60	Gran Bretaña
Hortalizas	12.2% de 49	Taiwan
Papas	25.8% de 132	E.U
Rábanos	30.3% de 132	E.U
Pepinos	10.9% de 92	E.U
Col	2.2% de 92	E.U
Champiñones	12% de 92	E.U
Lechuga	1.1% de 92	E.U

Fuente: Jay, 2000

Estudio revelan la incidencia del 45% en leche cruda, 95% en carne de cerdo, 60% carne de ave cruda, 79% en carne de vaca picada y 30% en algunas hortalizas. ( Jay, 2000)

Algunos reportes en E.U, leche de chocolate 11.6%, helados 2.0%-13.9%, y mantequilla (3.8%-6.7%) (Rybser, 1999)

## CAPITULO IV. MÉTODOS DE CONTROL DE LISTERIA

### 4.1 Factores que influyen en su desarrollo en plantas procesadoras de alimentos

Todos los microorganismos requieren ciertas condiciones que favorezcan su crecimiento y reproducción: alimento, acidez, tiempo, temperatura, oxígeno, humedad (Amjadi, 2005).

Dentro de las plantas de fabricación de alimentos se destacan algunos factores que influyen en el desarrollo de la bacteria:

Intrínsecos: pH,  $a_w$ /humedad, ingredientes antimicrobianos, competencia de microorganismos.

Externos: Temperatura y tiempo, Contaminación, ambiente en el empaque

A continuación se citan algunos factores más trascendentes que favorecen el desarrollo de la *Listeria monocytogenes* en plantas procesadoras de alimentos; muchas de ellas ocasionan contaminación cruzada y favorecen el desarrollo de nichos, donde se albergara la bacteria.

1. Inadecuada temperatura en el agua de enjuague en eliminación de proteínas o nutrientes durante la limpieza
2. Mal uso de las mangueras a presión durante la limpieza, facilitando se dispersen los microorganismos a otras áreas de proceso.
3. Limpieza de equipos al mismo tiempo que su esta procesando alimentos.
4. Limpieza de equipos sin un apropiado orden.
5. Pisos mojados en áreas de procesamiento.
6. Inapropiado proceso de secado en las áreas.
7. Tiempo y temperatura de almacenamiento de producto terminado y de ingredientes.
8. Traslado de alimento crudo a áreas de producto terminado.
9. Fallas en el proceso.

10. Niveles de germicidas no monitoreados.
11. Fallas en la efectividad del lavado y sanitización.
12. Manipulación de producto terminado con guantes utilizados en la manipulación de alimentos crudos o manejo de equipo.
13. Falla en la eliminación de la condensación.
14. Uso de carros de difícil limpieza para transportar ingredientes o productos.
15. Fallas en la protección a la exposición del producto.
16. Ductos y drenajes con residuos.
17. Sistemas de mantenimiento preventivo no implementados.
18. Áreas de producción alimentos listos para comer abiertas, Inadecuada separación de áreas (alimento crudo y terminado).
19. Frecuentes salidas y entradas entre las áreas de procesamiento.
20. Fallas en extractores de aire en la planta procesadora de alimentos.
21. Equipo de difícil limpieza y mantenimiento.
22. Ropa de personal sucia.
23. Huecos y grietas en el área de proceso, dificultando su limpieza.
24. Falta de limpieza y Sanitización de refrigeradores. (Kornack, 2005)

#### **4.2 Lugares de incidencia**

La entrada de la *Listeria monocytogenes* en las plantas de tratamiento de alimentos ocurre por medio de la tierra existente en los zapatos y en la vestimenta de los obreros y en el equipamiento de transporte, por medio de los animales que excretan la bacteria o tienen la piel o la superficie corporal contaminada, por medio de los tejidos vegetales crudos, de los alimentos crudos de origen animal, y posiblemente por medio de portadores humanos sanos. El crecimiento de las listerias es favorable por la humedad elevada en presencia de nutrientes. (CDS, 2005)

Es común en las plantas el desarrollo de nichos: sitio dentro del proceso de elaboración de alimentos donde los microorganismos se establecen y se multiplican, el sitio funciona como un reservorio de donde los microorganismos son dispersados y contaminan el equipo durante

la operación. Los nichos de mayor importancia se localizan después de un paso de mortalidad en el proceso (ej. Pasteurización). Paredes, techos mojados, profundidad en el piso, sistemas de drenaje en malas condiciones son algunos ejemplos de nichos) (Dexbury, 2004)

*L. monocytogenes* es detectada en los sumideros de los pavimentos, en el agua condensada y estancada, en los residuos y en el equipo de tratamiento. Es capaz de adherirse a varios tipos de superficies (que incluyen acero inoxidable, vidrio y el caucho).

La presencia de *L. monocytogenes* en la cadena de tratamiento se pone de manifiesto por la distribución amplia del organismo en los productos tratados. Los efluentes contaminados de las plantas de tratamiento de alimentos aumentan su difusión en el ambiente.

Relacionada al ambiente de procesamiento de los alimentos, la mayor incidencia esta asociada a las áreas húmedas de las plantas, pisos, bandas, grietas, áreas que dificulten su limpieza. (Caskie, 2001), encontrado en los lugares donde puede albergar son drenes, bandas transportadoras, cuartos de maduración del queso, pisos, cámaras de refrigeración, refrigeradores y áreas de proceso (Cortez, 2006).

### **4.3 Acciones preventivas y correctivas**

#### **4.3.1 Buenas prácticas de manufactura, HACCP**

La importancia de las buenas practicas de higiene a los empleados esta relacionada a la prevención de las enfermedades en alimentos. Se ha examinado la preevalencia de la contaminación de los alimentos en las manos de los trabajadores con *Listeria spp.* (Kerr, 2003)

Actualmente a prioridad de la legislación es identificar los riesgos y establecer procesos para controlar esos riesgos. (Adams, 1995, Griffith, 1995, Holt , 2000, North, 1993, Shears, 2004)

La responsabilidad en la higiene en los alimentos es de todos los que trabajan con ellos. (Amjadi, 2005), la labor hacia el futuro es el desarrollo de nuevas técnicas rápidas de identificación de nuevos patógenos, la identificación del genoma del patógeno, incorporación del sistema HACCP en la industria de alimentos a la nueva legislatura en las ciudades. (Griffith, 2006, Kivela, 2002, Wallace, 2005)

El Diario Oficial de la Comunidad Europea en 1990 publicó la importancia de los diferentes sectores de la industria alimentaria y el papel de las Buenas Prácticas de Higiene. Se mencionan los requerimientos generales en la fabricación, requerimientos de las áreas de proceso, transportes, desperdicios, agua, higiene personal (Fallows, 1994. Grigg, 1998, Shears, 2004)

La principal causa de las enfermedades transmitidas por alimentos son los errores en la compra, recepción, venta, preparación, fallas en la preparación de alimentos fríos y calientes, empleados infectados y la pobre higiene personal, preparación de los alimentos con mucha anticipación antes de ser servidos, ingredientes contaminados son incorporados a los alimentos, la temperatura de almacenamiento favorece el desarrollo microbiológico y contaminación cruzada. (Holt, 2000, Kerr, 2003)

Los factores que deben ser considerados en la inocuidad alimentaria:

a) Alimentos

b) Personas: Se Tomara en cuenta las Buenas Practicas de Higiene (GMP):

- Ropa limpia y apropiada. Cuando es de esperarse que los uniformes o vestimentas, debido al tipo de trabajo se ensucien rápidamente, entonces es recomendable el uso de delantales plásticos o de tela sobre los mismos y estar lo suficientemente ajustado para proteger la limpieza de los uniformes.

- Lavar las manos y sanearlas antes de iniciar el trabajo, después de cada ausencia del mismo y en cualquier momento durante la jornada cuando pueden estar sucias o contaminadas. Los operarios deberán lavar las manos desde la mitad del antebrazo hasta la punta de los dedos, con jabón, restregando con energía, usando cepillo para las uñas y temas de los dedos, después enjuagarse, sumergir las manos en una solución desinfectante y secarlas en el secador de aire o con toalla desechable de papel.

- Mantener las uñas cortas, limpias y libres de pintura y esmalte. Si se utilizan guantes que estén en contacto con el producto, serán impermeables y deberán mantenerlos limpios y desinfectados, con la misma frecuencia que el lavado de manos.

- Usar cubreboca, asegurando que se cubra nariz y boca
- Evitar cualquier contaminación con expectoraciones, mucosidades, cosméticos, cabellos, sustancias químicas, medicamentos o cualquier otro material extraño.
- El cabello debe mantenerse limpio, usar protección que cubra totalmente el cabello, y usarla en la planta todo el tiempo.
- Los bigotes deben ser cortos y mantenerse limpios. No deben rebasar la comisura de los labios, ni extenderse más allá de los lados de la boca, no se permite bigote bajo el labio que se extienda bajo la barbilla.
- La barba y el cabello facial no se permite, a no ser que este protegidos totalmente.
- Las patillas deben mantenerse limpias y recortadas, no mas largas que la parte inferior de la oreja con frecuencia.
- Las redes deben ser limpias y sin adornos, ya que estas pueden terminar dentro del producto. Se recomiendan que las aberturas en la redes, no sean mayores a 3mm. Y que sean de color que contraste con el color del cabello.
- Fumar, mascar, comer o beber sólo se podrá hacerlo en las áreas preestablecidas, en el donde el riesgo de contaminación sea mínimo.
- Se prohíben chicles, dulces u otros objetos en la boca durante el trabajo, ya que éstos pueden caer al producto en proceso.
- Prescindir de plumas, lapiceros, termómetros, lentes, herramientas, alfileres, sujetadores u otros objetos desprendibles en los bolsillos superiores de la vestimenta.
- No se deben usar joyas, ni adornos: broches para el cabello, pasadores, pinzas, aretes, anillo y relojes; collares u otros que puedan contaminar el producto; aún cuando se usen debajo de una protección.
- Queda prohibido estrictamente escupir en el área de proceso.
- Evitar estornudar y tose sobre el producto (uso obligatorio de cubreboca)
- Los operarios deben mantener un alto grado de limpieza personal. Se requiere que se presenten diariamente bañados, usen el cabello convenientemente recortado y los hombres estén bien afeitados.

- Evitar que las personas con enfermedades contagiosas, erupciones, heridas infectadas o mal protegidas, laboren en contacto directo con los productos. Será conveniente aislarlos y que efectúen otra actividad que no ponga en riesgo la calidad del producto.

- Cortadas y heridas deberán cubrirse apropiadamente con un material sanitario (gasas, vendas) y colocar encima algún material impermeable antes de entrar al área de proceso.

c) Sanitización equipos. Se efectúa usando combinada o separadamente métodos físicos o utilizando fluidos turbulentos y métodos químicos, ejemplo: mediante el uso de detergentes, álcalis o ácidos. El calor es un factor adicional importante en el uso de los métodos físicos y químicos.

Los detergentes deben tener la capacidad humectante y poder eliminar la suciedad de las superficies; así como mantener los residuos en suspensión; asimismo deben tener propiedades de enjuague, de suerte que se eliminen fácilmente del equipo los residuos de suciedad y detergente.

La desinfección da lugar a la reducción del número de microorganismos vivos, generalmente no mata las esporas bacterianas. Un desinfectante eficaz reduce el número de desinfección a un nivel que no perjudica la salud. Ningún procedimiento de desinfección puede dar resultados plenamente satisfactorios, a menos que a su aplicación proceda una limpieza completa.

d) Plagas. El control de plagas es aplicable a todas las áreas del establecimiento, manteniéndolas libres de insectos, roedores, pájaros u otros animales.

Los edificios deberán tener protecciones, para evitar la entrada de plagas, podrán utilizarse cortinas de aire, antecámaras, mallas, tejidos o electrocutadotes

(Amjadi, 2005, SSA, 1999)

Una de las medidas de la inocuidad esta en la aplicación tecnológica en los hogares, fortaleciendo la educación de la población (Lindgreen, 2003, Miles, 1999, Rodgers, 2005, Singleton, 2006). En donde los principales mensajes: el control de la temperatura es muy importante, limpieza de las cocinas, evitar la contaminación en los alimentos, no transitar por toda la cocina durante la preparación de los alimentos. (Worsfold, 1995)

Control de la temperatura en los alimentos: Después de la compra de los alimentos perecederos refrigerar o almacenar en congelación lo antes posible., Mantener constante la temperatura del refrigerador (alrededor 0-5°C), Antes de servir los alimentos verificar que deben estar hirviendo., No dejar alimentos perecederos en temperatura 10 - 63°C. (Pegg, 1999)

Lavado las manos: antes de la preparación de los alimentos, antes de comer o beber, después de ir al sanitario o tocar mascotas, después de manipular carne cruda.

Evitar la contaminación cruzada: lavar las manos con jabón, agua caliente y desinfectar antes de tocar los alimentos, usar toallas o trapos de cocina limpios, lavar superficies y utensilios después de cortar carne, pescado, pollo; almacenar productos crudos, cubriéndolos en un lugar específico del refrigerador. (Elsasser, 1999, Clayton, 2003, Duxbury, 2004, Breen, 2006, Kerr, 2005, Worsfold, 2003, Worsfold, 2001)

Para impedir la contaminación cruzada de los productos, todo el equipo y utensilios se limpiaran con la frecuencia necesaria y se desinfectarán siempre que las circunstancias, así lo exijan. Se tomaran las precauciones necesarias para impedir que el producto se contamine, cuando las áreas, el equipo y los utensilios se limpies o desinfecten con agua, detergentes y otros tensoactivos, o soluciones de éstos. (SSA, 1999)

## **Sistema HACCP**

La industria alimentaria en USA aprobó el uso de HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) en 1973. (Adams, 1995)

La gente demanda altos niveles en inocuidad y calidad de los alimentos, favoreciendo su consumo a productos que sean elaborados por empresas certificadas (Redmond, 2005, van der Spiegel, 2005, FSIS, 2003). La percepción del consumidor sobre la calidad en los alimentos es una de las razones de la compra o rechazo del producto. (Botonaki, 2006, Lindgreen, 2003, Manning, 2004)

El objetivo del sistema HACCP es proteger al alimento de la contaminación y minimizar los efectos de esta cuando ocurra. (Wallace, 2005) Es desarrollado en 1960s en la preparación de alimentos para los astronautas, promoviendo la inocuidad en estos. (Amjadi 2005, Milton, 2002, Jackson, 2006, Nguyen, 2004, van der Spiegel, 2005)

El HACCP es un sistema preventivo el cual consiste en una serie de acciones que permiten identificar y evaluar todos aquellos elementos que pueden plantear una amenaza para la salud del consumidor para lograr niveles de riesgo insignificante en el producto final. HACCP considera todos los pasos del proceso (producción, cosecha, selección de ingredientes, procesamiento, mercado y condiciones de almacenamiento final; permite la implementación de medidas preventivas para controlar los riesgos derivados de peligros significativos, esto favorecerá la reducción en costos al haber disminución de pérdidas (Khandaker, 2005, Maher, 2001, Manning, 2006, Nguyen, 2004, Pineda, 2005, Worsfold, 2006)

Es necesario tomar en cuenta la materia prima, recepción, transporte y almacenamiento, personal, registros y POES (Procedimientos de operación estándar).

1.- Realizar un análisis de peligros (físicos, químicos, biológicos) e identificar las medidas de control. Análisis de peligros: el proceso de obtener y evaluar la información de peligros asociados con el alimento para decidir cuales son significativos

2.- Identificación de Puntos Críticos de Control: esencial para prevenir o eliminar peligros o reducirlos a un nivel aceptable.

La identificación de Listeria no debe ser un punto crítico de control ya que la buenas prácticas de manufactura deberán prever y controlar su presencia.

3.- Establecer límites críticos: un valor máximo o mínimo al cual un parámetro biológico, químico o físico debe ser controlado a un punto crítico de control para prevenir, eliminar o reducir la posibilidad de que ocurra el peligro, a un nivel aceptable.

4.- Monitoreo de cada punto crítico de control: par obtener una secuencia planeada de las observaciones o parámetro, para evaluar si un punto crítico de control este bajo control y generar datos precisos para su uso en la verificación.

5.- Establecer acciones correctivas para ser tomadas en cuenta cuando ocurre una desviación de un límite crítico.

6.- Establecer procedimientos de verificación: otras actividades a parte del monitoreo que determinen la validez del plan HACCP

7.- Establecer un sistema de mantenimiento.

(Cortez, 2006, Adams 2001, Griffith, 2006, Grigg, 1998, Manning, 2004, Soliman, 2000, Wallace, 2005)

Medidas de control:

a).En granjas productoras de leche deberán estar limpias, debe haber un buen control microbiológico en la alimentación, limpieza, control de mastitis en los animales y una correcta sanitización del equipo destinado para la obtención de la leche. Las buenas prácticas en la producción de la leche disminuirá el numero de la bacteria en estudio.

b) Camionetas, camiones de carga utilizados para el transporte de alimentos, deberán limpiarlos y sanitizados.

c) Deberá haber controles contra animales y plagas en las plantas procesadoras de alimentos.

d) Evitar contaminación cruzada, deberá haber separación entre producto crudo y terminado.

e) Las plantas procesadoras deberán contar con un programa del control de la calidad, en todos los parámetros relacionados con el producto, incluyendo el control del personal.

f) Realizar monitoreos microbiológicos (pisos, paredes, techos, equipos, coladeras, principalmente en zonas húmedas).

g) Control en la limpieza y sanitización de los equipos. (Doyle, 2001, Morrison, 1998)

h) Eliminación de residuos o desechos en la industria alimentaria: Eliminación: eliminación total por procesos, Reducción: minimización de los residuos desde su origen,

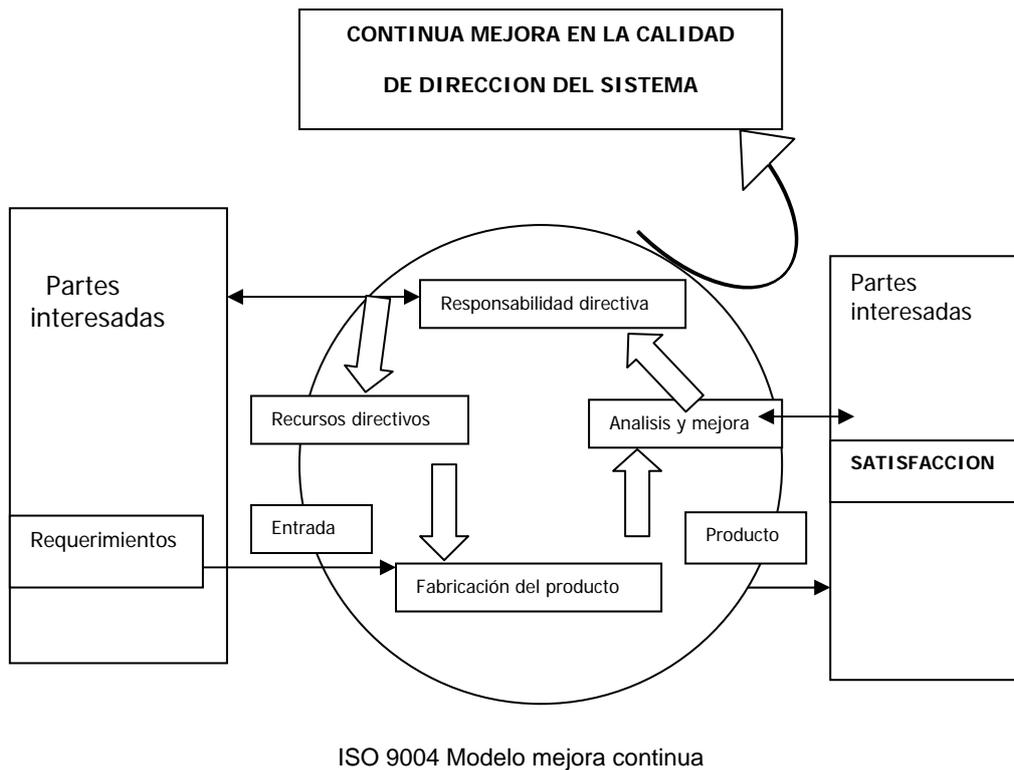
Reuso: reciclar la mayor parte de los desechos producidos, Recuperación: transformación en energía, Destrucción: Última opción (incinerar o colocar en depósitos) . (Bates 1999, FSIS 1999)

1996 FSIS se publica en rol en la destrucción de la bacteria y el HACCP, y la adopción de SOPs (Sanitation Standard Operating Procedures) para disminuir la posibilidad del crecimiento de la bacteria en productos terminados. (Gallegher, 2003)

En Rusia, las regulaciones se han complementado mediante estándares que define los límites biológicos y químicos estableciendo la tolerancia en alimentos. Estándares son documentados en el medical-biological Requirements and Health Standards for Food and Processed-food Ingredient Quality (MBRH), Esta legislación obliga a las diferentes organizaciones relacionadas con elaboración de alimentos contar con su certificado en un laboratorio acreditado. (Caskie, 2001)

2001 se plantea un modelo en platas Monte Carlo caracterizado por la relación entre las especies de listeria en las plantas básicamente en productos lácteos. (Hepner, 2004). La industria de bebidas también ha adoptado estos modelos (Mann, 1999)

a) Concentración inicial de *L. monocytogenes*  
b) cantidad de microorganismos presentes en las superficies de producción  
c) análisis en superficies, producto en proceso, sanitizantes, intervenciones después del empaque. Mediante un programa matemático se monitorea el crecimiento y expansión de la bacteria.(Gallegher, 2003). Se incorpora al sistema HACCP el ISO 9004 al sistema HACCP en donde se describe la participación de las partes interesadas en la mejora del ciclo, en la última satisfacción (Hepner 2004)



En lo referente a la industria se recomienda:

- Mejorar el diseño higiénico de los equipos para evitar que se formen nichos de microorganismos
- Establecer procesos para destruir la bacteria una vez envasado el alimento, por ej. pasterización, irradiación, etc.
- Usar aditivos o conservadores que retardan el desarrollo de *Listeria*
- Modificar las practicas de los operarios cuando sea necesario
- Establecer sectores bien separados para aislar completamente los productos cocidos de los crudos
- Extremar la higiene en las salas de feteado y de envasado (Hutton, 2002)

Otros sistemas de calidad como la ISO 9000, fundamentada en las buenas prácticas de higiene, buenas practicas de manufactura y en el sistema HACCP brindan una alternativa de inocuidad y calidad en los alimentos (Grigg, 2001, Rohitratana, 2001)

#### 4.3.2 Monitoreos

La prevención es sumamente importante en aquellos alimentos que están listos para ser consumidos (LPC) y permiten el desarrollo de *L. monocytogenes* y no recibirán luego de envasados ningún tratamiento que elimine *Listeria*. Es usual el control en las líneas de producción del genero *Listeria* en plantas que elaboran productos listos para consumirse

Los días y la hora del muestreo se realizan al azar para reflejar las variaciones propias de la planta. Los sitios de muestreo son aquellos que tienen alta probabilidad de transformarse en un nicho ó eventualmente en un biofilm (Lindsay, 2006) y que podrían potencialmente contaminar al producto.

Las muestras pueden ser procesadas en "pool" ó compuesta sobre todo cuando los controles son negativos. Para estos ensayos se busca género *Listeria* ya que la presencia de cualquiera de las especies refleja un riesgo de la posible presencia de *L. monocytogenes*.

Tompkin manifiesta que es posible ejercer control sobre *Listeria* en las áreas que elaboran alimentos LPC pero su experiencia en 10 a 12 plantas durante 10 años en E.U. muestra que es imposible eliminarla completamente. (FAO, 2006)

#### **4.3.3 Contaminación cruzada**

Se presentan mas de tres millones de casos anualmente de enfermedades transmitidas por alimentos en E.U asociado a una inadecuada cocción de alimentos y por contaminación cruzada ( McCurdy, 2006)

El conocimiento acerca de los patógenos es un importante motivador de la inocuidad en los alimentos (Reijnders, 2004). El conocimiento de la cocción del alimento juega una de las piezas importante. (FAO, 2006). Debe haber una relación entre la inocuidad alimentaria y las practicas de manipulación. (Kennedy, 2005, McCurdy, 2006)

Se debe evitar la contaminación cruzada principalmente entre materias crudas y producto terminado, para ello se deben tomar medidas de en el control ya que esta es una de principales causas de contaminación del alimento.(Gibbons, 2006, Masniyom, 2005)

#### **4.3.4 Desinfección**

Los desinfectantes deben ser seleccionados considerando los microorganismos que se desea eliminar, el tipo de producto que se elabora y el material de las superficies que entran en contacto con el producto. La selección depende también del tipo de agua disponible y el método de limpieza empleado. El uso continuo de ciertos desinfectantes químicos pueden dar lugar a la selección de microorganismos resistentes. Deben usarse desinfectantes químicos cuando no sea viable la aplicación de calor.

Todos los sanitizantes en uso, deberán estar previamente aprobados por Control de Calidad o por los organismos oficiales de referencia.

Desinfección por calor: Es una de las formas más comunes y útiles de desinfección, es aplicar calor húmedo para elevar la temperatura de la superficie a por lo menos 80°C; sin embargo las temperaturas elevadas desnaturalizan los residuos proteicos y los endurecen sobre la superficie del equipo. Por lo tanto es esencial eliminar todos los residuos de los productos, antes de aplicar calor por desinfección.

Desinfección con agua caliente: Las piezas desmontables de las máquinas y los componentes pequeños se pueden sumergir en un tanque o sumidero con agua que se mantenga a una temperatura de desinfección durante un periodo adecuado, por ejemplo, a 80°C durante 2 minutos. El enjuague con desinfectante en lavadoras mecánicas debe alcanzar esta temperatura de desinfección y el periodo de inmersión debe ser suficiente para que en la superficie del equipo se alcance esta temperatura.

Desinfección con vapor: la temperatura de la superficie deberá elevarse al punto de desinfección durante un tiempo determinado. Las lanzas que emiten chorros de vapor son útiles para desinfectar las superficies de la máquina y otras superficies de difícil acceso, o que hayan que desinfectarse sobre el piso del establecimiento.

El uso de vapor puede generar problemas al causar la condensación de agua sobre otros equipos o piezas de las estructura. No es adecuado el tratamiento con calor cuando el vapor a alta temperatura descarapele la pintura de las superficies y elimine los lubricante de las piezas móviles

Desinfección con sustancias químicas:

*Cloro y productos a base de cloro, incluidos los compuestos de Hipocloruro:* Si se utilizan debidamente, pueden considerarse entre los mejores para los establecimientos,

pudiendo obtenerse soluciones concentradas de hipoclorito de sodio líquido que contiene de 100,000 a 130,000 miligramos de cloro por litro (ppm), o mezclarse con detergentes en forma de cristales clorados. Estos desinfectantes tienen un efecto rápido sobre una gran variedad de microorganismos, y son relativamente baratos. Deben usarse en concentraciones de 100 a 200 miligramos de cloro por litro y es necesario enjuagar lo antes posible las superficies desinfectadas después de un tiempo suficiente de contacto. Los desinfectante clorados, con excepción del bióxido de cloro, pierden su eficacia ante la presencia de residuos orgánicos.

Desinfectantes fenolíticos e hipocloritos reducen sustancialmente la contaminación bacteriana pero su efecto persiste por tres a seis horas. Para los organismos que forman películas, el clorito de sodio, basado en un desinfectante oxyhalogénico ha sido efectivo.(Duggan, 1998, Lindsay,2006, Masniyom, 2005)

*Yodoforos:* Estos compuestos siempre se mezclan con un detergente en un medio ácido, por lo que no muy convenientes en los caos en que se necesite un limpiador ácido, su efecto es rápido y tienen una amplia gama de actividad microbiana. Para superficies limpias, normalmente se necesita, una solución de unos 25 a 50 miligramos por litro de yodo disponible a pH 4. Pierden su eficacia con material orgánico. No son tóxicos cuando se emplean en concentraciones normales. Suelen tener acción corrosiva en los metales, por lo que debe tenerse especial cuidado en eliminarlos enjuagando las superficies después de utilizarlos.

*Compuestos cuaternarios de amonio:* Presentan buenas características detergentes. Son incoloros, relativamente no corrosivos de los metales y no son tóxicos, pero pueden tener sabor amargo. No son tan eficaces contra las bacterias gram negativas como el cloro y yodo. Las soluciones tienden a adherirse a las superficies de entre 200- 1200 miligramos por litro (mg/l). Se requieren concentraciones más altas cuando se emplean con aguas duras. No son compatibles con jabones o detergentes aniónicos.

*Agentes anfóteros tensoactivos:* Constan de un agente activo con propiedades detergentes y bactericidas. Son de baja toxicidad, relativamente no corrosivos, insípidos e inodoros, y son eficaces cuando se usan de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Pierden su eficacia con material orgánico.

*Ácidos y álcalis fuertes:* Además de sus propiedades detergentes, tienen considerable actividad antimicrobiana. Debe tenerse especial cuidado de que no contaminen los alimentos. Después de un tiempo adecuado, todas las superficies que han sido desinfectadas deberán someterse a un enjuague con agua.

*Fenol y compuesto relacionados:* utilizado para la desinfección de sanitarios y cuartos de vestir, el difenil fenol se usa para impregnar las envolturas de frutas cítricas y evitar el crecimiento de hongos. El pentaclorofenol se usa extensamente en la preservación de la madera como agente fungicida, es soluble en agua y tiene alta toxicidad para el ser humano.

*Agentes gaseosos esterilizantes:* el óxido de etileno es muy efectivo contra los microorganismos, pero sumamente inflamable y explosivo, y por lo tanto se vende como carboxido que es una combinación de 90% de óxido de etileno y un 10% de CO<sub>2</sub> para reducir sus características explosivas e inflamables. No se permiten residuos en los alimentos tratados con éste producto.

El ozono (O<sub>3</sub>) se ha utilizado en el control de microorganismos en los alimentos y la desinfección del agua. Es muy tóxico para el ser humano, su efectividad se deduce a temperaturas relativamente altas. Su uso se limita a esterilización superficial ya que no tiene acción permanente.

#### Desinfección con agentes físicos:

Calor seco y Húmedo, Radiación ultravioleta, radiaciones ionizantes y esterilización por filtrado (SSA, 1999)

La efectividad de un sanitizante se evalúa con un 87.5% de efectividad. (Gallagher, 2003)

Su resistencia es uno de los problemas de la sanitización en la industria de alimentos, frecuentemente aislada en las líneas de producción, área de almacenamiento y de empaque.

Los métodos para prevenir el crecimiento de la Listeria y otros patógenos en productos cárnicos incluyen la reducción del pH, actividad de agua, adición de químicos y la utilización de una bacteria ácido láctica (LAB). (Teixeira, 2005)

El uso de sanitizantes postcosecha reduce las poblaciones o microorganismos, pero su eliminación no se puede llevar a cabo por completo debido a los cambios sensoriales del producto. La importancia radica en la prevención de la contaminación en cada etapa: cosecha, producción, procesamiento, almacenamiento. (Beuchat, 2006)

El uso de Nisin, bactericida contra *L. monocytogenes* en concentración de 30 g/ml y la aplicación del sistema lactoperoxidasa es una alternativa de “esterilización fría” en productos lácteos, básicamente en quesos (Sarkar, 2006)

#### **4.3.4 Tratamiento térmico**

Es importante recalcar la trascendencia del tratamiento térmico y la necesidad de aplicar el sistema HACCP y la introducción de las Buenas Prácticas de Manufactura dentro de la industria alimentaria, como medida para la reducción del riesgo potencial para la salud pública. (Reuben, 2003)

Se deben tener controles muy estrictos en lo referente al tratamiento térmico que tendrá el producto final, esto reducirá la posibilidad de contaminación con bacterias patógenas, principalmente con *Listeria monocytogenes*. (Kierstan, 1995)

El uso de la radiación como alternativa de reducción de patógenos en productos crudos y terminados es una práctica cada vez más frecuente en la industria (Sommers, 2005)

## **CAPITULO V. *Listeria monocytogenes* EN MÉXICO**

Entre 1980 y 1989 el Laboratorio Nacional de Salud reportó que los quesos en particular fueron responsables del 32% de los brotes y la leche también ocupó el 15% de participación. De 2000 a 2002, México reportó que los lácteos también siguen siendo un problema con un 8% de participación.

México padece una elevada morbilidad de enfermedades asociadas al consumo de alimentos de mala calidad sanitaria. Las diarreas ocupan un lugar preponderante como causa de enfermedad. En años anteriores; la diarrea de los niños, era la primera causa de mortalidad y la segunda de morbilidad en adultos. Ahora ocupa el quinto lugar; pero sigue siendo un problema de Salud Pública. Se asume que los alimentos de mala calidad sanitaria están determinando este problema en más del 70% de los eventos que se presentan. La frecuencia de *Listeria* en queso fresco según datos de la Universidad de Guadalajara: en queso tipo panela de un 45% de muestras positivas, se encontró un 27% de *Listeria monocytogenes* y 18% de otras especies de *Listeria*; en el queso ranchero, de 39% de muestras positivas, se reportó un 23% de *Listeria monocytogenes* y 16% de otras especies de *Listeria*. (Énfasis, 2006)

La estadística de la incidencia de esta bacteria en nuestro país es prácticamente nula y la existente no es de fácil acceso al usuario. Se revisaron bases de datos de la Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, Laboratorio Nacional de Salud y Bibliotecas de la UNAM, IPN, UAM y no se encontró información que pudiera ser utilizada.

Por el momento en México, la *Listeria monocytogenes* no es una preocupación primordial para ser atendida a diferencia de otros países desarrollados como E.U o países europeos, en donde la comida lista para ser consumirse es una de las principales fuentes para adquirir esta enfermedad. Es tal vez por este motivo que en nuestro país no haya suficiente información al respecto, sin embargo el daño que por la severidad que causa a la salud (abortos) deberá ser retomado desde plantas que elaboran alimentos listos para comer, concientización del consumidor y autoridades competentes.

La frecuencia de *Listeria* en queso fresco según datos de la Universidad de Guadalajara: en queso tipo panela de un 45% de muestras positivas, se encontró un 27% de *Listeria monocytogenes* y 18% de otras especies de *Listeria*; en el queso ranchero, de 39% de muestras positivas, se reportó un 23% de *Listeria monocytogenes* y 16% de otras especies de *Listeria*. (Énfasis, 2006)

A continuación se presenta la estadística realizada en un laboratorio de análisis de alimentos en la Ciudad de México, analizados mediante la técnica de BAX. Estudio realizado el año pasado que pretendió mostrar la incidencia de la *Listeria* y *L. monocytógenes* en 1082 muestras de diferentes matrices alimentarias.

Se registraron 799 análisis para *Listeria spp.* De los cuales 644 resultaron negativos (66%) y 155 positivos (34%). (Gráfico 1). Las muestras analizadas corresponden a: 771 esponjas. Muestras tomadas de monitoreos en superficie a plantas procesadoras de alimentos lácteos, cárnicos, aves y vegetales principalmente., 3 leche, 23 muestras de pollo, 2 vegetales (Gráfico 3)

Para el caso del análisis de la *L. monocytogenes*, se registraron 283 estudios; reportándose: 214negativos (75%) y 69 positivos (25%). (Gráfico 2). de las cuales: 247 esponjas, 4 carnes molida, 12 muestras de leche fluida, 14 muestras de pollo, 5 quesos, 1 yogurt. Los resultados positivos para *L. Monocytogenes* hacen referencia a 1 carne, 10 muestras de pollo, 57 esponjas y 1 leche fluida (Gráfico 4) (Valle, 2006)



Gráfico 1. Análisis estadístico

*Listeria spp.*

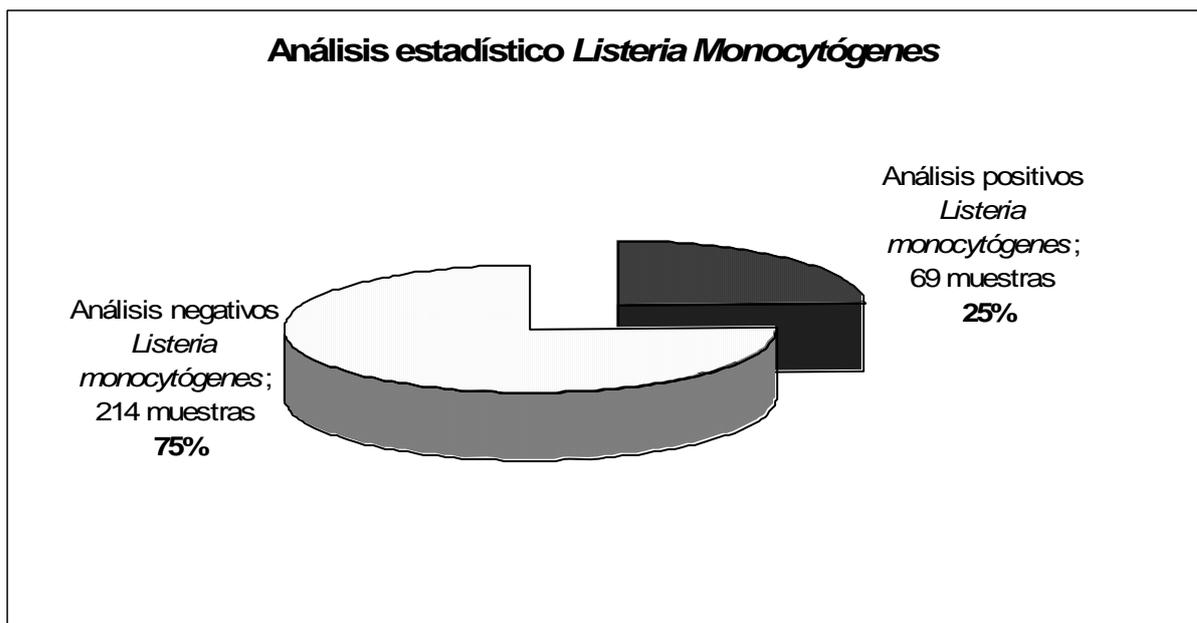


Gráfico 2. Análisis estadístico *Listeria monocytógenes*

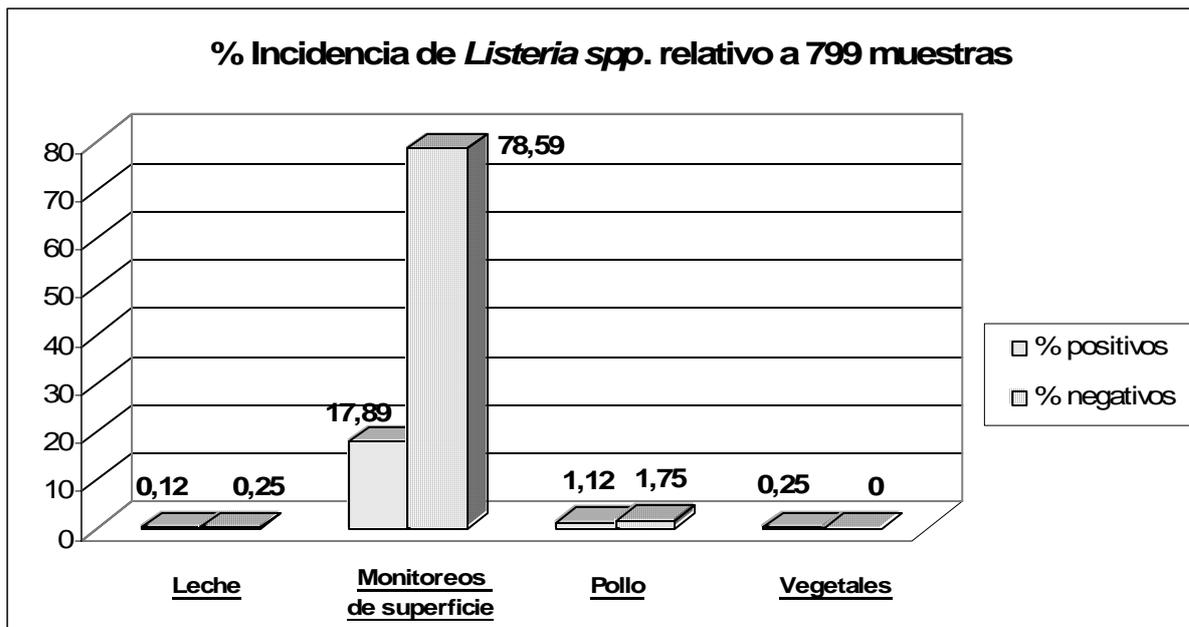


Gráfico 3. % Incidencia de *Listeria spp.* relativo a 799 muestras

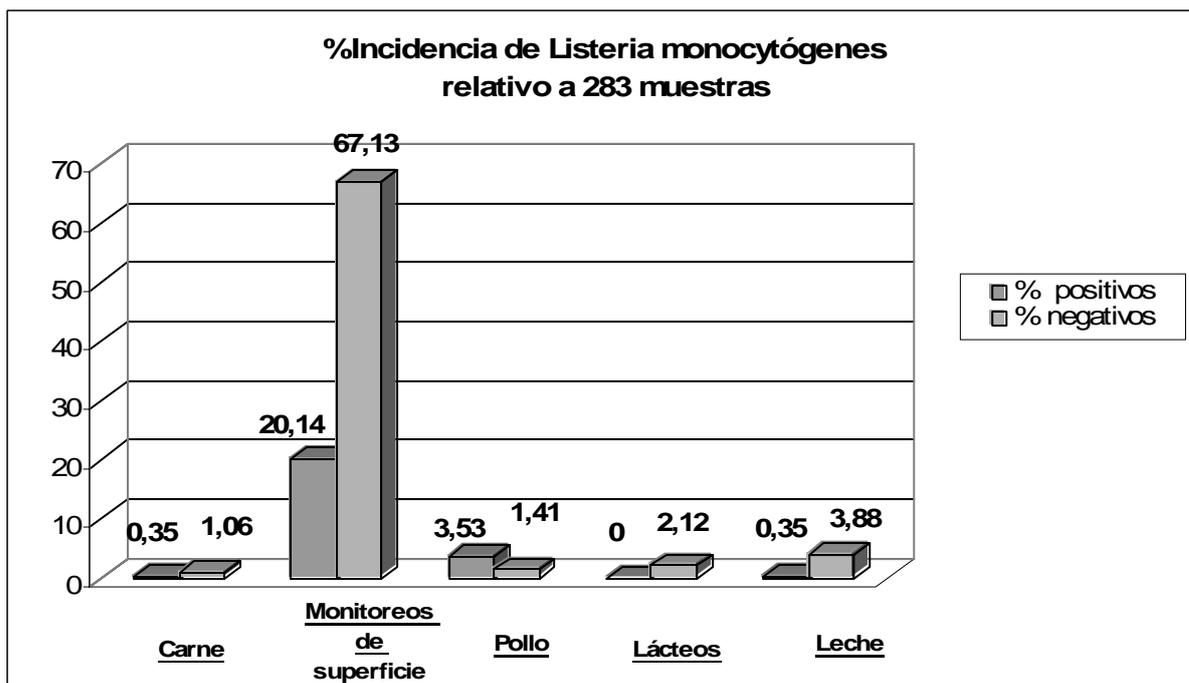


Gráfico 4. % Incidencia de *Listeria monocytogenes*. relativo a 283 muestras

Las estadísticas muestran una notable incidencia para la bacteria en estudio un 34% para *Listeria spp.* y un 25% en el caso de *Listeria monocytogenes*. Destacando la importancia

de los monitoreos de superficies realizados con esponjas a las plantas de alimentos, ya en estos se haya la mayor incidencia de esta bacteria.

Cabe destacar la presencia de la *Listeria spp.* en pollo, lácteos y vegetales; en el caso de *Listeria monocytogenes* es necesario resaltar la presencia en carne, pollo y leche, en donde el riesgo del consumo de estos productos es alto ya que la mayoría de estos alimentos están listos para su distribución y venta. Por lo que es necesario poner mayor énfasis a las buenas prácticas de manufactura, resaltando la correcta implementación del sistema HACCP en todas las plantas procesadoras de alimentos.

La detección oportuna de la bacteria mediante monitoreos en diferentes puntos de las plantas debe ser uno de los principales controles ya que con esto se deberán tomar las medidas necesarias y evitar la proliferación de la *Listeria*.

## CONCLUSIONES

1. La *Listeria monocytogenes* es un bacteria oportunista, distribuida ampliamente en la naturaleza, microorganismo patógeno causante de enfermedades en humanos y animales.
2. Las principales enfermedades causadas por la *Listeria monocytogenes* es la listeriosis, meningitis y abortos en mujeres. Su diagnóstico se complica debido a que los síntomas pueden aparecer de 2 a 6 semanas.
3. Los alimentos con mayor incidencia de esta bacteria: leche, derivados lácteos (helados, quesos, postres), carne (res, cerdo, pollo y pavo), huevo, embutidos, verduras, y ensaladas.
4. Los sitios frecuentes para el almacenamiento de esta bacteria son las áreas húmedas de las plantas, pisos, bandas, grietas, coladeras, cámaras de refrigeración, básicamente áreas que dificulten su limpieza.
5. Es necesario enfatizar el uso las buenas practicas de manufactura y la correcta implementación del sistema HACCP, ya que esto permitirá la oportuna detección y eliminar el riesgo de crecimiento y distribución de la listeria monocytogenes. Cabe destacar que las principal fuente de contaminación con *Listeria monocytogenes* es debido a la contaminación cruzada.
6. El papel actual de las enfermedades transmitidas por alimentos ha sido una de las mayores preocupaciones a nivel mundial, por lo que es necesario educar a la población en el rol que cada uno juega en la cadena de producción y distribución de los alimentos.
7. En México las estadísticas son escasas sobre la incidencia de *L. monocytogenes*, por lo que sería conveniente analizar la importancia de esta bacteria a la par del desarrollo de nuestro país.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Adams A. Food safety: the final solution for the hotel and catering industry. *British Food Journal* 97(4): 19-23, 1995
2. Adams A. The use of models in the maintenance of the hygienic quality of foods. *Nutrition & Food Science*. 31(5):234-237, 2001
3. Amjadi K., Hussain K. Integrating food hygiene into quantity food production systems. *Nutrition & Food Science*. 35(3):169-183, 2005
4. Bates M. and Phillips P. Sustainable waste management in the food and drink industry. *British Food Journal* 101(8): 580-589, 1999
5. Bell C, et al., *Listeria*. Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza España, p143- 152, 2000
6. Berrada H, Soriano J.M., Mañes Y.P. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. *International Journal of Foods Microbiology* 107: 202-206, 2006
7. Beuchat L. Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. *British Food Journal* 108(1):38-53, 2006
8. Botonaki A., Polymeros K., Tsakiridou E., Mattas K. The role of food quality certification on consumers' food choice. *British Food Journal* 108(2):77-90, 2006
9. Breen A., Brock S., Crawford K., Docherty M. The refrigerator safari. An educational tool for undergraduate students learning about the microbiological safety of food. *British Food Journal* 108(6): 487-494, 2006
10. Caskie P. and Davis J. The emerging food-safety industry in Russia. *European Business Review* 13(6):365-372, 2001
11. Chae M. S., Schraft H., Truelstrup L., Mackereth R. Effect of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiology* 23: 250-259, 2006
12. Chils N. M., Batista B. L. Japanese food wholesaling: US comparisons and future issues. *British Food Journal* 99(11): 447-455, 1997
13. Clayton D. A., Griffith C. J., Price P. An investigation of the factors underlying consumers' implementation of specific food safety practices. *British Food Journal*, 105(7): 434-453, 2003
14. Cortez A. HACCP Para la Fabricación de Queso Análogo. Centro de Investigación en alimentación y desarrollo A. C. 15(4) : 3-4, 2006

15. Dale B., Farley. Unsanitary Sandwich Firm Gets FDA's Attention. *FDA Consumer*. 36, 1990
16. Dimara E., Skuras D. Consumer demand for Informative labeling of quality food and drink products: a European Union case study., *Journal of Consumer Marketing* 22(2): 90-100, 2005
17. Dimond H., Ford F. and Fraser R. The eating for pregnancy. *Nutrition & Food Science*. 3: 8- 14, 1994
18. Doyle M. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers 2<sup>nd</sup>*. Ed. borne bacterial pathogens. ASM Press Washinton USA. Pág. 284-309, 2001
19. Duggan J. and Phillips C. A Listeria in the domestic environment. *Nutrition & Food Science*. 2: 73-79, 1998
20. Duxbury D. Laboratory. *FoodTechnology*. 58(7): 74-76, 2004  
HACCP (.Duxbury, 2004)
21. Eley A. Escherichia coli 0157: an increasingly significant food-poisoning pathogen. *Nutrition & Food Science*. 3: 96-100, 1997
22. Elsasser C. Food for thought on food safety. *Nutrition & Food Science*. 99(3): 140-143, 1999
23. Erkin L., Helms M., Turkkan U. and Morris D. The economic emergence of Turkey. *European Business Review* 12(2): 64-74, 2000
24. Fallows S.F. Implementing the EC General Food Hygiene Directive. *British Food Journal* 96 (8): 44-46, 1994
25. Fraser O. P. and Sumar S. Compositional changes and spoilage in fish (part II) microbiological induced deterioration. *Nutrition & Food Science* 6:325-329, 1998
26. Gallagher D., Ebel E and Kause J. FISI Risk Assessment for Listeria monocytogenes in Deli Meats. 2003
27. Gettis M. Guidelines for food packaging and inserts printing inks for direct food contact. *Pigment & Resin Technology* 26(2):102-108, 1997
28. Gibbons I., Adesiyun A., Seepersadsingh N., Rahaman S. Investigation for possible source(s) of contamination of ready- to-eat meat products with Listeria spp. and other pathogens in a meat processing plant in Trinidad. *Food Microbiology* 23:359-366, 2006
29. Griffith C. Food safety: where from and where to?. *British Food Journal* 108(1):6-15, 2006
30. Griffith C.. HACCP and the management of healthcare associated infections. *International Journal of Health Care Quality Assurance*. 19(4): 351-367, 2006
31. Griffith C.J., Mullan B. and Price P.E. Food safety: implications for food, medical and behavioural scientists. *British Food Journal* 97(8): 23-28, 1995

32. Grigg N. Statistical process control in UK food production: an overview. *International Journal of Quality & Reliability Management* 15(2):223- 238, 1998
33. Hepner I., Wilcock A., and Aung M. Auditing and continual improvement in the meat industry in Canada. *British Food Journal* 106 (7): 553-568, 2004
34. Hilton J. Reducing foodborne disease: meeting the Food Standards Agency`s targets. *Nutrition & Food Science*. 32 (2):36-50, 2002
35. Holt G. and Henson S.J. Information for good hygiene practice in small businesses. *British Food Journal* 102( 4):320-337, 2000
36. <http://apps.unicordoba.edu.co/revistas/revistamvz/MVZ-51/46.pdf> , 2007
37. Hunter P. R., Hornby H., Campbell C. K. and Browne K. F. Isolation of Food Spoilage Yeasts from Salads Purchased from Delicatessens. *British Food Journal* 96(3): 23-25, 1994
38. Hutton T. Sodium, technological functions of salt in the manufacturing of food and drink products. *British Food Journal* 104 (2):126-152, 2002
39. Jackson L. Towards a South African model for food safety auditor registration. *British Food Journal* 108(1):16-26, 2006
40. Jay M. *Microbiología Moderna de los alimentos*. 3ª Ed. Acribia. Zaragoza. España. Pág. 601-636, 2000
41. Jay J. *Modern food Microbiology*. 5ª Ed. Chapman & Hall. USA. Pag. 478-499, 1996
42. Kennedy J., Jackson V., Cowan C., Blair I. And McDowell D., Bolton D. Consumer food safety knowledge. *British Food Journal* 1(7): 441-452, 2005
43. Kerr K., Seale K. Prevalence of *Escherichia coli* 0157 on the hands of food- workers. *British Food Journal* 105(10):678-681, 2003
44. Khandaker S. A., Alauddin M. Economic analysis of food-borne diseases control program in Australia. *International Journal of Social Economics* 32.(9): 767-782, 2005
45. Kirstan M. Food hygiene, quality and safety: to towards the year 2000. *British Food Journal* 97(10): 8-10, 2005
46. Kivela J., Lam M., Inbakaran R. Food safety in school catering in the People`s Republic of China. *International Journal of Contemporary Hospitality Management* 14/6: 301-312, 2002
47. Klas S. D., Lavine C. L., Whitt M. A., Miller M. A.. IL-12-assisted immunization against *Listeria monocytogenes* using replication-restricted VSV based vectors. 24:1451-1461, 2006
48. Kornacki J. Controlling *Listeria* in the Food Processing Environment. *FoodTechnology* 11(05):36-42, 2005
49. Kupiec B., Revell B. Speciality and artisanal cheese today: the product and the consumer. *British Food Journal* 100(5): 236-243, 1998

50. Lindgreen A., Hingley M. The impact of food safety and animal welfare polices on supply chain management, *British Food Journal* 106(6): 328-349, 2003
51. Lindgreen A. Trust as a valuable strategic variable in the food industry. *British Food Journal* 105(6):310-327, 2003
52. Lindsay D. and Von Holy A. What food safety professionals should know about bacterial biofilms. *British Food Journal* 108 (1): 27-37, 2006
53. Macias M. Papel patógeno actual de *Listeria monocytogenes*. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D.F., Pág. 2-15, 1992
54. Maher D. Integrated software for hygiene management., *Nutrition & Food Science*. 31(1): 77-30, 2001
55. Mann R., Adebajo O. and Kehoe D. Best practices in the food and drinks industry. *British Food Journal*. 1(3): 238-253, 1999
56. Mann R., Adebajo O., Kehoe D. An assessment of management systems and business performance in the UK food and drinks industry. *British Food Journal*, 102(1): 5-21, 1999
57. Manning L. and Baines R. Globalisation: a study of the poultry-meat supply chain. *British Food Journal* 106(10/11): 819-836, 2004
58. Manning L., Baines R. and Chadd S. Food safety management in broiler meat production. *British Food Journal* 108(8):605-621, 2006
59. Manning L., Baines R.N. Effective management of food safety and quality. *British Food Journal* 106( 8): 598-606, 2004
60. Manual de Buena Prácticas de Higiene y Sanidad. Secretaria de Salud, Subsecretaria de Regulación y Fomento Sanitario. México: 9-56, 1999
61. Masniyom P., Benjakul S., Visessanguan W. Synergistic antimicrobial effect of pyrophosphate on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in modified atmosphere packaged and refrigerated seabass slice. *LWT* 39:302-307, 2005
62. Mastronicolis S. K., Boura A., Karaliota A., Magiatis P., Arvanitis N., Litos C., Tsakirakis A., Paraskevas P., Moustaka H., Heropoulos G. Effect of cold temperature on the composition of different lipid classes of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*: Focus on neutral lipids. *Food Microbiology* 23: 184-194, 2006
63. Matos A., Guzmán E., Escalona A., Otero M. Peligros biológicos en alimentos. *Revista electrónica de Veterinaria REDVET*, ISSN 1695-7504. VI(09): 1-5, 2005
64. McCurdy S., Takeuchi M., Edwards Z. Edlefsen M. and Kang D., Mayes V., Hillers V. Food safety education initiative to increase consumer use of food thermometers in the United States. *British Food Journal* 103(3): 170-186, 2001

65. Mead G. C. Microbiological Hazards from Red Meat and Their Control. *British Food Journal* 96(8): 33-36, 1994
66. Meldrum R. J., Smith R.M.M., Ellis P., Garside J. Microbiological quality of randomly selected ready-to-eat foods sample between 2003 and 2005 in Wales. UK. *International Journal of Foods Microbiology* 03562:1-4, 2006
67. Miles S, Braxton D., Frewer L.J. Public perceptions about microbiological hazards in food. *British Food Journal* 101(10): 744-762, 1999
68. Morrison P, Caffin N., Wallace R. Small establishments still on amber light for adopting Australian HACCP-based food safety code. *British Food Journal* 100(8): 364-370, 1998
69. Morrison P., Caffin N., Wallace R. Small establishments present challenge for Australian food safety code. *International Journal of Contemporary Hospitality Management* 10(3):101-106, 1998
70. Nguyen T. Wilcock A. and Aung M. Food safety and quality systems in Canada. *International Journal Of Quality & Reliability Management* 21(6): 655-671, 2004
71. Nigel P. G., Catherine McAlinden. A new role for ISO 9000 in the food industry?. Indicative data from the UK and mainland Europe. *British Food Journal*, 103(9): 644-656, 2001
72. Norma Oficial Mexicana. NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria Monocytogenes*.
73. North R. The prevention of Food Poisoning: A Strategy for Deregulation. *British Food Journal* 96(1): 29-36, 1994
74. Oliver D. Foodborne diseases. Academia Press. United Kingdom. Chapter 18. Pag. 247-257, 1990
75. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud "33a Sesión del subcomité de planificación y programación del comité ejecutivo", (1999): 3-14
76. Pawsey P. K., Howard P. Drinking ice as a vector for gastrointestinal disease. *British Food Journal* 103 (4): 253-263, 2001
77. Pegg A. Shelf- life. *Nutrition & Food Science*. 99 (3): 131-135, 1999
78. Pineda F. and Kleiner B. Management of Operations in the Snack Industry. *Management Research News*. 28(2/3): 118-126, 2005
79. Powell M. R., Tamplin M., Marks B., Campos D. T. Bayesian synthesis of a pathogen growth model: *Listeria monocytogenes* under competition. *International Journal of Foods Microbiology* 03566:1-13, 2006
80. Poyart-Salmeron C., Carlier C., Trieu-Cuot P., Courtieu A., Courtieu P. Transferable Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in *Listeria Monocytogenes*. *The Lancet*. 335:1422-1426, 1990
81. Redmond E. C and , Griffith C. J. Factors influencing the efficacy of consumer food safety communication. *British Food Journal* 107 (7): 484-499, 2005

82. Reijnders L. Food safety, environmental improvement and economic efficiency in the Netherlands. *British Food Journal* 106(5): 388-405, 2004
83. Rodgers S. Applied research and educational needs in food service management. *International Journal of Contemporary Hospitality Management*, 17( 4): 302-314, 2005
84. Rohitratana K. and Boon-itt S. Quality standard implementation in the Thai seafood processing industry. *British Food Journal* 103(9):623-630, 2001
85. Reuben A., Treminio H., Arias M., Chávez C. Presencia de *Escherichia coli* o157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en alimentos de origen animal en Costa Rica. *Publicación Oficial de la Sociedad Latinoamericana de nutrición*. 53(4): 1-5 , 2003
86. Ryser E., Marth E. *Listeria, Listeriosis and Food safety*. Second edition. Ed. Marcel Dekker Inc. USA. Pág 359-400, 1999
87. Sarkar S. Shelf- life extension of cultured milk products. *Nutrition & Food Science*. 36 (1): 24-31, 2006
88. Sharp J.C.M and Reilly W.J. Recent Trends in Foodborne Infections in Europe and North America. *British Food Journal* 96(7): 24-34, 1994
89. Shears P., Zollers F., Hurd S. The European Food Safety Authority. *British Food Journal* 106(4): 336-352, 2004
90. Singleton J., Val V. The extension programme and food safety education in the USA. *British Food Journal* 108(9):771-774, 2006
91. Soliman F. Application of knowledge management for hazard analysis in the Australian dairy industry. *Journal of Knowledge Management*, 4(4): 287-294, 2000
92. Sommers C., Boyd G. Variations in the radiation sensitivity of foodborne pathogens associated with complex ready- to- eat foods products. *Radiation Physics and Chemistry* 75:773-778, 2006
93. Spiegel M., Luning P. A., Ziggers G.W. and Jongen W.M. Development of the instrument IMAQE-Food to measure effectiveness of quality management. *International Journal of Quality & Reliability Management*. 22(3): 234-255, 2005
94. Teixeira de Carvalho A., Aparecida de Paila R. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic bacterium isolated from Italian salami. *Food Microbiology* 23: 213-219, 2005
95. Torres Vitela M.R. Un método rápido para detección de patógenos. *Énfasis alimentación* 5, 2006
96. Valle P. Datos estadísticos listeria monocytogenes. Silliker 2006
97. Van A. E, Zwietering M. H. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Foods Microbiology* 107:72-82, 2006
98. Varman A., Evans M. *Foodborne pathogens*. Wafe Publi Shing Ltd. England. Pág. 327-353, 1991

99. Wallace C. A. and Powell S. C. Development of methods for standardised HACCP assessment, British Food Journal 107(10): 723-742, 2005
100. Wallace C. and Powell S. Post-training assessment of HACCP knowledge: its use as a predictor of effective HACCP development, implementation and maintenance in food manufacturing. British Food Journal 107(10): 743-759, 2005
101. Worsfold D. Food safety at shows and fairs. Nutrition & Food Science. 33(4):159-164, 2003
102. Worsfold D. Food safety behaviour in butchers' shops. Nutrition & Food Science. 31(1): 13-18, 2001
103. Worsfold D. Recipe for food safety. Nutrition & Food Science. 6: 22-25, 1995
104. Worsfold D. HACCP workshops-practical guidance for small fast food businesses. Nutrition & Food Science. 36(1): 32-42, 2006
105. [www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis\\_g\\_span.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_g_span.htm) Centers for Disease Control and Prevention. 2005
106. <http://db.doyma.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/doyma/mrevista.fulltext?pident=13056892> Multilocus sequence typing: the molecular marker of the Internet era, 2007.
107. [www.fao.org/ag/againfo/subjects/es/health/diseases-cards/cards/listeria.html#top](http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/es/health/diseases-cards/cards/listeria.html#top) sanidad animal tarjetas de las enfermedades. 2006
108. [www.fda.gov/bbs/topics/ENFORCE/ENF00226.html](http://www.fda.gov/bbs/topics/ENFORCE/ENF00226.html), 1993
109. [www.fsis.usda.gov/OA/news/2003/rtdedata.htm](http://www.fsis.usda.gov/OA/news/2003/rtdedata.htm). Food Safety and Inspection Service. Listeria In FSIS Ready-To-Eat Products Shows Significant Decline. USDA. 2003
110. [www.fsis.usda.gov/OA/recalls/prelease/pr090-2002.htm](http://www.fsis.usda.gov/OA/recalls/prelease/pr090-2002.htm). Food Safety and Inspection Service. Pennsylvania Firm Expand Recall Of Turkey And Chicken Products For Possible Listeria Contamination. USDA. 2002
111. [www.fsis.usda.gov/OA/topics/lmguid.htm](http://www.fsis.usda.gov/OA/topics/lmguid.htm). Food Safety and Inspection Service. Listeria Guidelines for Industry, USDA. May 1999
112. [www.fsis.usda.gov/OA/topics/lm\\_action.htm](http://www.fsis.usda.gov/OA/topics/lm_action.htm). Food Safety and Inspection Service. Revised Action Plan for Control of Listeria monocytogenes for the Prevention of Foodborne Listeriosis. USDA. May 2000
113. [www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/99-025N.htm](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/99-025N.htm). Food Safety and Inspection Service. Compliance with the HACCP System regulations and request for comment, USDA. 9(616):1999
114. [www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/00-025N.htm](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/00-025N.htm). Food Safety and Inspection Service. Listeria Monocytogenes and Inspection Service, USDA. 9(616):1999
115. [www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/97-013F.htm](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/97-013F.htm). Food Safety and Inspection Service. FSIS Rule Designed to Reduce Listeria monocytogenes in Ready-to-eat Meat and Poultry Products. USDA. 9(430), 2003

116. [http://www.seimc.org/control/revi\\_Bacte/listeria.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/listeria.htm). Centro Calidad SEIMC. Listeria y Listerosis. 2005

117. Yeung R. and Morris J. Food safety risk. Consumer perception and purchase behaviour. British Food Journal 108(9):775-794, 2006