

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

“Incidencia y distribución de *Listeria monocytogenes* en una planta procesadora de hortalizas congeladas: Impacto de las características del patógeno en su capacidad para prevalecer en el ambiente”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Q.A. Angélica Godínez Oviedo

DIRIGIDA POR

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, DICIMEMBRE DE 2014.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Incidencia y distribución de *Listeria monocytogenes* en una planta procesadora de hortalizas congeladas: Impacto de las características del patógeno en su capacidad para prevalecer en el ambiente”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

Q.A. Angélica Godínez Oviedo

DIRIGIDA POR

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Presidente


Firma

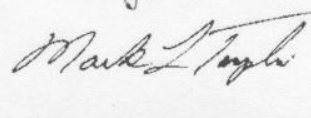
Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Secretario


Firma


Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Vocal


Firma


Dr. Mark L. Tamplin

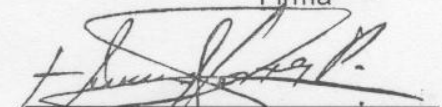
Suplente


Firma

Dr. Javier Castro Rosas

Suplente


M.S.P Sergio Pacheco Hernández
Directo de la Facultad de Química


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un patógeno que puede prevalecer dentro de plantas procesadoras de hortalizas congeladas. El objetivo de este proyecto fue establecer la incidencia y distribución de *L. monocytogenes* a lo largo del proceso de producción de hortalizas congeladas y estudiar la relación que tiene este patógeno con otros microorganismos, así como el efecto de la adaptación al sustrato sobre su comportamiento durante su desarrollo, la formación de biopelículas y su tolerancia ante tratamientos de desinfección y escaldado. Durante más de un año muestras de producto, superficies de contacto directo y no contacto con el producto fueron recolectadas. En todas las muestras se determinó la presencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*. Las cepas aisladas del patógeno fueron tipificadas mediante la técnica de campos eléctricos pulsados (PFGE). En muestras de superficies de contacto se determinó el contenido de bacterias mesófilas aerobias (BMA), coliformes totales (CT) y bacterias ácido lácticas (BAL). La relación entre *L. monocytogenes* y *Listeria* spp. se evaluó mediante la prueba de Pearson, y su relación con los microorganismos indicadores mediante una regresión logística. Por último se evaluó *in vitro* e *in vivo* la adaptación a extracto vegetal de cepas de *L. monocytogenes* aisladas durante los muestreos usando métodos de recuento en placa y espectrofotométricos. Las cepas adaptadas y no al extracto vegetal inoculadas en hortalizas se sometieron a tratamientos de desinfección y escaldado. La incidencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* fue de 10.04 y 6.69%, 9.29 y 5.58%, y 28.78 y 27.27% en producto, superficies de contacto directo y superficies de no contacto respectivamente. La técnica de PFGE reveló que las cepas que persistían dentro de la empresa eran las correspondientes al pulsotipo B. En todos los tipos de muestras se encontró una correlación positiva ($P < 0.0001$) entre *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*. En las muestras de superficies de contacto la media estimada de BMA, CT y BAL fue de 4.11, 2.49 y 2.92 Log UFC/100cm²; BMA y CT mostraron una correlación positiva con la presencia del patógeno ($P < 0.05$). En los experimentos *in vitro* se observó que la adaptación al extracto vegetal tuvo un efecto positivo sobre el desarrollo del patógeno. La formación de biopelículas fue mayor en caldo soya tripticaseína a 25°C /2 d por parte de las células no adaptadas. Los tratamientos de desinfección y escaldado bajo las condiciones que se aplican en la empresa son efectivos para la eliminación de *L. monocytogenes*.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, *Listeria* spp., microorganismos índice, adaptación al sustrato, hortalizas.

SUMMARY

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen that can prevail inside frozen-vegetable processing environment, because of its environmental origin, its ubiquity and its adaptation ability to different kinds of stress. The main goal of the present study was to establish the incidence and distribution of *L. monocytogenes* during the frozen-vegetable processing, and to study its relationship between microbial indicators and *Listeria* spp. as well as the effect of substrate adaptation on its development, its biofilms formation and its resistance during disinfection and blanching treatments. During one year, samples from product, contact-surfaces and non-contact surfaces were collected. In all the samples, the presence of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* was determined. The *L. monocytogenes* isolated strains were typified by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Also aerobic plate count (APC), total coliforms (TC) and lactic acid bacteria (LAB) were quantified exclusively in contact-surfaces samples. The relationship between *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* was determined by Pearson test, and the correlation of microbial indicators with *L. monocytogenes* was calculated by logistic regression. Finally, the substrate adaptation of isolated *L. monocytogenes* strains using spectrophotometric and traditional methods. The isolated strains adapted to substrate and non-adapted was inoculated on vegetables and subjected to disinfection and blanching treatments. The general incidence of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in vegetables, contact-surfaces and non-contact surfaces was 10.04 and 7.53, 9.29 and 5.58, 28.78 and 27.27 %, respectively. In all samples, a positive correlation ($P < 0.0001$) was found between *Listeria* spp. and *L. monocytogenes*. The PFGE revealed that strains belonging to pulsotype B were spread in the plant environment. In samples from contact-surfaces, the estimated median of APC, TC and BAL was 4.11, 2.49 and 2.92 Log CFU/100 cm², respectively; only APC and TC showed a significant correlation with the pathogen presence ($P < 0.05$). On the other hand, in *in vitro* analysis the strain's substrate adaptation had a positive effect on its growth in the vegetal extract. Biofilms formation was higher in TSB at 25°C/ 2d by non-adapted subtracted stains. Disinfection and blanching treatments under conditions employed in the industry were effective to inactivate *L. monocytogenes*.

Keywords: *L. monocytogenes*, index microorganism, substrate adaptation, vegetables

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ii
---------------	----

SUMMARY	iii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Hortalizas congeladas.....	3
2.1.1 Procesamiento.....	3
2.1.2 Microbiología	5
2.1.3 Principales microorganismos patógenos	6
2.1.4 Fuentes y mecanismos de contaminación.....	7
2.1.5 Persistencia de patógenos en plantas procesadoras de hortalizas congeladas	8
2.1.5.1 Adaptación física a diversos factores	8
2.1.5.2 Adherencia a superficies de contacto.....	12
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	13
2.2.1 Características generales	13
2.2.2 Mecanismo invasivo de infección	15
2.2.3 Virulencia.....	16
2.2.4 Sobrevivencia y desarrollo.....	17
2.2.5 Efecto de los tratamientos térmicos y congelación.....	18
2.2.6 Persistencia dentro de plantas procesadoras.....	18

2.3 Medidas de control para evitar enfermedades por consumo de frutas y hortalizas congeladas	19
2.3.1 Microorganismos índices	20
2.3.2 Trazabilidad	21
2.3.3 Programas control	21
2.3.3.1 Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)	22
2.3.3.2 Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)	22
2.3.3.3 Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP)	22
3 JUSTIFICACIÓN	24
4 OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos específicos	25
5 METODOLOGÍA	26
5.1 Incidencia y distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en un planta procesadora de hortalizas congeladas	26
5.1.1 Muestreos durante el proceso de producción	26
5.1.2 Análisis microbiológicos	28
5.1.2.1 Cuantificación de microorganismos indicadores en superficies de contacto directo	28
5.1.2.2 Detección y aislamiento de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en los tres tipos de muestra	29

5.2 Tipificación molecular de cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas dentro de la empresa	30
5.3 Relación entre <i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria</i> spp. y microorganismos indicadores.....	32
5.3.1 Relación entre <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	32
5.3.2 Relación entre <i>L. monocytogenes</i> y microorganismos indicadores en superficies de contacto directo	32
5.4 Efecto de la adaptación al sustrato de células de <i>L. monocytogenes</i> sobre su capacidad de desarrollo en extracto vegetal y la formación de biopelículas...32	
5.4.1 Selección de las cepas	32
5.4.2 Preparación del extracto vegetal (EV)	33
5.4.3 Preparación del inóculo de cepas adaptadas y no adaptadas al sustrato.....	33
5.4.4 Desarrollo de células de <i>L. monocytogenes</i> (adaptadas y no al sustrato) en un extracto vegetal (EV)	35
5.4.5 Formación de biopelículas por células de <i>L. monocytogenes</i> (adaptadas o no al sustrato).....	35
5.4.6 Análisis estadístico	36
5.5 Efecto de la adaptación al sustrato de células de <i>L. monocytogenes</i> en la resistencia a tratamientos de desinfección y escaldado	36
5.5.1 Desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> en el extracto vegetal (EV ¹).....	37
5.5.1.1 Preparación del extracto vegetal (EV ¹)	37
5.5.1.2 Cepas	37

5.5.1.3 Preparación del inóculo.....	37
5.5.1.4 Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en CSTEEL y EV ¹	37
5.5.2 Tratamientos de desinfección y escaldado.....	38
5.5.2.1 Preparación de las muestras e inoculación.....	38
5.5.2.2 Desinfección de hortalizas frescas inoculadas con <i>L. monocytogenes</i> ...	38
5.5.2.3 Escaldado de hortalizas frescas inoculadas con <i>L. monocytogenes</i> ..	40
5.5.2.4 Efecto de los procesos continuos de desinfección y escaldado sobre la viabilidad de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en hortalizas frescas	40
5.5.3 Análisis estadístico	40
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
6.1 Incidencia y distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	41
6.2 Trazabilidad de la contaminación de <i>L. monocytogenes</i> dentro de la planta procesadora de hortalizas congeladas mediante la tipificación molecular por la técnica de campos eléctricos pulsados.....	47
6.3 Relación de <i>L. monocytogenes</i> con <i>Listeria</i> spp. y microorganismos indicadores.....	52
6.3.1 Relación entre la presencia de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	52
6.3.2 Contenido de microorganismos indicadores y su relación con la presencia de <i>L. monocytogenes</i>	54
6.4 Adaptación al sustrato de células de <i>L. monocytogenes</i> y su efecto sobre el desarrollo en EV	59

6.5 Efecto de la adaptación al sustrato de células <i>L. monocytogenes</i> sobre su capacidad de formar biopelículas	68
6.6 Efecto de la adaptación al sustrato de células de <i>L. monocytogenes</i> sobre su capacidad de desarrollo y de resistencia a la desinfección y escaldado	80
6.6.1 Efecto del sustrato y la temperatura de incubación sobre el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i>	80
6.6.2 Efecto de la adaptación al sustrato sobre la adherencia de <i>L. monocytogenes</i> a hortalizas frescas.	83
6.6.3 Efecto de la adaptación al sustrato de células de <i>L. monocytogenes</i> inoculadas en hortalizas sobre su resistencia a la desinfección y escaldado	84
7 CONCLUSIONES	91
8 BIBLIOGRAFÍA CITADA	93
9 ANEXOS	104

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Ventajas y desventajas del escaldado por inmersión como pre tratamiento a la congelación	5
2	Limites de crecimiento y sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i>	18
3	Muestras colectadas durante el procesamiento de hortalizas congeladas	27
4	Condiciones de PCR para la identificación de <i>L. monocytogenes</i> mediante el gen <i>hlyA</i>	31
5	Incidencia de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> durante el procesamiento de frutas y hortalizas congeladas	42
6	Pulsotipos de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de la planta procesadora de hortalizas congeladas durante siete muestreos	50
7	Tabla de contingencia de la relación entre <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en hortalizas congeladas	54
8	Tabla de contingencia de la relación <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en superficie de contacto directo con el producto	54
9	Tabla de contingencia de la relación entre <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en superficies de no contacto	54
10	Efecto de la concentración de bacterias indicadoras sobre la presencia de <i>L. monocytogenes</i> en superficies de contacto con el alimento	59
11	Cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de la empresa resistentes y susceptibles a ácido peracético	60
12	Efecto de diversos factores y algunas de sus interacciones sobre la velocidad de desarrollo de <i>L. monocytogenes</i>	65
13	Efecto de diversos factores y sus interacciones sobre la formación de biopelículas por <i>L. monocytogenes</i>	71
14	Parámetros de desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> en dos diferentes sustratos durante el almacenamiento a 25 y 4°C	83
15	Porcentaje de adherencia en hortalizas frescas de células de <i>L. monocytogenes</i> cultivadas en diferentes medios de cultivo	84

16 Análisis de varianza del efecto del tratamiento desinfectante y el medio empleado previamente para el crecimiento *L. monocytogenes*.

87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama de flujo de la elaboración de hortalizas congeladas	4
2	Efecto de tratamientos subletales sobre células microbianas (Wu, 2008)	9
3	Relación entre el estado fisiológico de las células microbianas y el tipo de estrés al que fueron expuestas (Yousef y Juneja, 2003).	10
4	Representación esquemática del ciclo de vida intracelular de <i>L. monocytogenes</i> (López et al., 2006)	16
5	Diagrama de flujo del procedimiento realizado para evaluar el efecto de la adaptación al sustrato sobre el desarrollo y formación de biopelículas de las cepas seleccionadas de <i>L. monocytogenes</i> .	34
6	Diagrama de flujo del efecto de la adaptación al sustrato de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en brócoli ante tratamiento de desinfección y escaldado solos y combinados.	39
7	Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> en la línea de empackado 1.	44
8	Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> en la línea de empackado 3.	45
9	Pulsotipos de <i>L. monocytogenes</i> encontrados dentro de la empresa procesadora de hortalizas congeladas.	48
10	Dendograma de los pulsotipos obtenidos de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de la planta procesadora de hortalizas congeladas empleando la enzima Apa1.	49
11	Distribución de los pulsotipos de <i>L. monocytogenes</i> dentro de las áreas de procesamiento de hortalizas congeladas	51

12	Contenido de bacterias indicadoras en superficies de contacto directo dentro de la planta procesadora de hortalizas congeladas.	56
13	Histogramas de la relación entre la concentración de bacterias indicadoras en presencia o ausencia de <i>L. monocytogenes</i> en superficies de contacto directo con el producto en una empresa de vegetales congelados	58
14	Comportamiento durante el desarrollo de cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de una empresa de vegetales congelados y una cepa de referencia (ATCC 19115) en diferentes medios de cultivo, expuestas previamente a CST y EV.	62
15	Efecto de la adaptación al sustrato sobre el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en diversos medios de cultivo.	64
16	Efecto de la historia previa de la célula sobre la velocidad de desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> .	65
17	Efecto del sustrato sobre la velocidad de desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> .	66
18	Cinética de inactivación del ácido peracético respecto al tiempo	67
19	Efecto de la interacción entre el tipo de cepa y la historia previa de la célula sobre la velocidad de desarrollo de <i>L. monocytogenes</i>	68
20	Formación de biopelículas en microplaca por cepas de <i>L. monocytogenes</i> expuestas previamente a CST y EV	70
21	Efecto de la interacción el tipo de cepa y la historia previa de la célula en la formación de biopelículas por cepas de <i>L. monocytogenes</i>	72

22	Efecto de la interacción entre las condiciones de almacenamiento y la historia previa de la célula en la formación de biopelículas por cepas de <i>L. monocytogenes</i>	73
23	Efecto de la interacción entre la historia previa de la célula y el sustrato empleado en la producción de biopelículas por cepas de <i>L. monocytogenes</i>	74
24	Efecto de la interacción entre el sustrato y las condiciones de almacenamiento en la producción de biopelículas por cepas de <i>L. monocytogenes</i>	75
25	Correlación entre el crecimiento y la formación de biopelículas a 25°C durante 2 días por células de <i>L. monocytogenes</i> .	76
26	.Correlación entre el crecimiento y la formación de biopelículas por <i>L. monocytogenes</i> expuesta previamente a un extracto vegetal a 25°C durante 2 días.	77
27	Correlación entre el crecimiento y la formación de biopelículas por <i>L. monocytogenes</i> expuesta previamente a CST a 4°C durante 7 días	78
28	Correlación entre el crecimiento y la formación de biopelículas por <i>L. monocytogenes</i> expuesta previamente a un extracto vegetal a 4°C durante 7 días.	79
29	Grafica modelada del comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en dos diferentes sustratos durante el tiempo. A) 25°C, B) 4°C.	81
30	Reducción en la población de <i>L. monocytogenes</i> cultivada en CSTEL y EV1 por efecto de la desinfección de brócoli crudo	85
31	Reducción en la población de <i>L. monocytogenes</i> cultivada en CSTEL y EV1 por efecto de la desinfección de coliflor cruda.	85

32	Reducción en la población de <i>L. monocytogenes</i> cultivada en CSTEEL y EV1 por efecto de la desinfección de zanahoria cruda.	86
33	Efecto de la interacción entre los tratamientos de desinfección y el sustrato empleado previamente para el cultivo de las células sobre la reducción de <i>L. monocytogenes</i> en brócol	88
34	Efecto de la adaptación al sustrato sobre el escaldado y desinfección/escaldado de hortalizas frescas	90

1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la sociedad está más preocupada por cuidar su salud y tener una dieta balanceada, por esta razón se ha incrementado el consumo de productos hortofrutícolas. No obstante dicho incremento se ha asociado directamente con el aumento de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, siendo las más frecuentes las causadas por agentes patógenos de naturaleza microbiana (Sapers, 2001). Algunos de los microorganismos más relacionados con este tipo de productos son *Salmonella* spp, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Cyclospora cayetanensis*, *Giardia lamblia*, virus de la Hepatitis A y *Bacillus cereus* (Beuchat, 1998; Sapers *et al.*, 2006).

La presencia de microorganismos patógenos en frutas y hortalizas depende del manejo durante la producción del cultivo, cosecha y poscosecha. En la precosecha las causas de contaminación se pueden deber a la exposición a tierra, materia fecal de humanos y animales, fertilizantes, aire, aguas negras y a las personas que están implicadas en el cuidado del cultivo (Beuchat, 1998); en la cosecha el humano es la principal fuente de contaminación; por último en la poscosecha la contaminación ocurre principalmente en las etapas de acondicionamiento, empaçado, transporte o almacenamiento. Sin embargo, no todos los productos hortofrutícolas constituyen el mismo riesgo al ser consumidos; en el caso de los productos mínimamente procesados y procesados, los diversos tratamientos a los que son expuestos durante su procesamiento pueden modificar las poblaciones bacterianas presentes desde un principio e inclusive eliminar microorganismos patógenos.

Las frutas y hortalizas precocidas y/o congeladas se clasifican dentro de los productos de bajo riesgo microbiológico, ya que el escaldado y la congelación eliminan y previenen el desarrollo de patógenos. A pesar que ello, se han reportado brotes de enfermedad por estos productos causados principalmente por virus, como el de la Hepatitis A. No obstante otros patógenos como *L. monocytogenes* podrían estar presentes en este tipo de productos y llegar a provocar brotes de enfermedad,

debido principalmente a que es un patógeno de elevada ubicuidad y que se ha aislado con regular frecuencia de hortalizas crudas como de precocidas y congeladas por lo que es un riesgo potencial, principalmente para personas hipersensibles como embarazadas, ancianos, niños y adultos inmunodeprimidos.

La incidencia de *L. monocytogenes* en productos hortofrutícolas congelados dentro de plantas procesadoras según diversos estudios puede ir del 1.2 hasta 46% (Aguado *et al.*, 2001; Pappelbaum *et al.*, 2008). Algunas de las características que le permiten a este patógeno prevalecer en los ambientes de las plantas procesadoras de alimentos son su capacidad para formar biopelículas en los equipos, de adaptarse al estrés y de sobrevivir largos periodos a temperaturas de congelación.

Para controlar la presencia de *L. monocytogenes* dentro de las industrias dedicadas a la producción de hortalizas congeladas implementan programas control como, las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES) y el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en ingles). En México existe una empresa dedicada a la producción este tipo de productos, que a pesar de contar con los programas control mencionados tiene problemas de contaminación con *L. monocytogenes*. Para poder implementar estrategias eficaces de control del patógeno dentro de la empresa es necesario generar información científica sobre las características de las cepas de *L. monocytogenes* que se encuentran durante el proceso. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue determinar la incidencia y distribución de *L. monocytogenes* dentro de una planta procesadora de hortalizas congeladas, evaluar su relación con microorganismos indicadores y *Listeria* spp., así como estudiar algunas características de las cepas aisladas del proceso que les permitan prevalecer dentro del ambiente de producción.

2 ANTECEDENTES

2.1 Hortalizas congeladas

Las hortalizas son cualquier planta herbácea hortícola que se puede utilizar como alimento, ya sea en crudo o cocinado (CAE, 2011). Estos productos son alimentos percibidos por los consumidores como saludables, debido a la gran cantidad de sustancias fitoquímicas y nutritivas que contienen, muchas de estas sustancias se encuentran científicamente documentadas como benéficas para la salud (Sapers *et al.*, 2006).

Hoy día el ritmo de vida tan acelerado de las personas, ha provocado que el sector de producción de hortalizas listas para el consumo aumente en cuanto a diversidad y cantidad de producción, siendo los productos congelados un importante nicho de mercado por su fácil manejo y la conservación de sus características sensoriales y nutricionales. Además de las ventajas a la salud, en nuestro país las hortalizas congeladas tiene una gran importancia económica con generación de \$294,932 000 dólares por exportación anual y participando con el 9.8 % de las exportaciones del producto a nivel mundial (SIAP, 2013).

2.1.1 Procesamiento

Las etapas principales durante el procesamiento de hortalizas congeladas como son: recepción de la materia prima, cortado, lavado y desinfección, escaldado, congelación, empaque, almacenamiento y transporte. En la Figura 1 se observa un diagrama general del proceso de producción hortalizas congeladas, el cual puede variar dependiendo de la empresa que lo realicé.

El punto de partida de la producción empieza cuando las materias primas llegan a la empresa, estas deben ser evaluadas en base a criterios de calidad definidos y específicos. Posteriormente el producto seleccionado pasa por la etapa

de corte, en la cual se reduce el tamaño, para generar las porciones adecuadas para el consumidor. Otra etapa es el lavado y/o desinfección, estos procesos son unos de los más importantes, ya que remueven la tierra y otros contaminantes, así como los microorganismos que se puedan encontrar presentes en el producto (Torreggiani *et al.*, 2000).

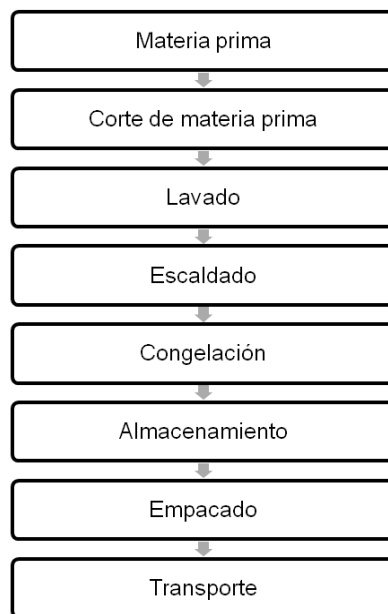


Figura 1. Diagrama de flujo de la elaboración de hortalizas congeladas

Las etapas claves en la producción de hortalizas congeladas son el escaldado y la congelación. El escaldado, es un tratamiento térmico comúnmente usado para inactivar enzimas responsables del deterioro y se puede realizar mediante inmersión o por vapor (Torreggiani *et al.*, 2000). En el Cuadro 1 se listan algunas ventajas y desventajas del escaldado como un pretratamiento a la congelación.

Cuadro 1. Ventajas y desventajas del escaldado por inmersión como pre tratamiento a la congelación

Ventajas	Desventajas
Inactivación de enzimas responsables del oscurecimiento y de otros colores.	Conduce a la muerte de tejido celular lo que incrementa la posibilidad de deterioro de la textura.
Mejora el color verde de los vegetales.	Aumento de la sensibilidad del alimento al ataque por microorganismos.
Disminuye el contenido microbiano.	

(Torreggiani *et al.*, 2000).

La congelación es uno de los métodos de conservación de los alimentos más viejo y más usado, ya que mantiene el sabor, textura y valor nutricional de los alimentos, además de reducir las reacciones químicas e impedir el crecimiento de microorganismos (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2005). Por lo que sigue siendo uno de los métodos más efectivos en preservación de los productos agrícolas almacenados durante largos periodos.

2.1.2 Microbiología

El ecosistema microbiano en las hortalizas es muy diverso y complejo. Las diferencias en la morfología de la superficie del producto y en las funciones metabólicas de las hojas, tallos, floretes, frutas, raíces y tubérculos proporcionan una amplia gama de nichos ecológicos selectivos para grupos específicos de microorganismos (Burnett y Beuchat, 2001). Sin embargo, la presencia y el número de microorganismos no sólo dependen del tipo de producto, sino también de las prácticas agronómicas, la zona geográfica de producción, el tiempo y las condiciones antes de la cosecha. Por otro lado los ecosistemas microbianos que se generan después de la cosecha puede estar influenciados por la manipulación y las condiciones de almacenamiento, así como las condiciones de elaboración, envasado, distribución y comercialización (Fernández, 2000; Burnett y Beuchat, 2001).

Las hortalizas congeladas muestran una baja carga microbiana, debido principalmente a la temperatura de almacenamiento y a tratamientos previos a la congelación, como es el caso del escaldado. El proceso de escaldado contribuye a disminuir o eliminar la carga microbiana incluida la de microorganismos patógenos, aunque esta no es su función principal. Generalmente, la flora que se encuentra en estos productos congelados refleja la contaminación que ocurre después del escaldado (NAS, 1975). El número de microorganismos que se encuentran en mezclas de hortalizas congeladas oscilan entre 2 y 7 Log UFC/g, pero usualmente está entre 4 y 6 Log UFC/g (Manani *et al.*, 2006). En la mayoría de las hortalizas congeladas, los microorganismos que predominan son las bacterias ácido lácticas (KA, 2005; Manani *et al.*, 2006), entre las que destacan *Leuconostoc mesenteroides* y los enterococos. Algunos microorganismos deterioradores que se han aislado de estos productos son: *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Corynebacterium*, bacterias ácido lácticas, *Flavobacterium* y *Cryptococcus* spp. (Manani *et al.*, 2006).

2.1.3 Principales microorganismos patógenos

Las hortalizas congeladas son consideradas alimentos de bajo riesgo debido a tres razones: los productos reciben un tratamiento térmico (escaldado), los microorganismos no pueden crecer a temperatura de congelación y la mayoría de los vegetales congelados son consumidos cocinados (ICMSF, 2005). Sin embargo, de la superficie de estos productos se han aislado algunos agentes patógenos como *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y esporas de *Clostridium botulinum* (ICMSF, 2005; Manani *et al.*, 2006). La presencia de dichos patógenos en estos productos puede provenir de aquellas cepas que se encontraban en el campo y lograron sobrevivir a los procesos de acondicionamiento del producto, o ingresar a ese producto en procesos posteriores al escaldado, procedentes tanto del hombre o del equipo.

Se han reportado algunos brotes asociados al consumo de productos hortofrutícolas congelados. Entre los alimentos implicados se encuentran fresas y frambuesas contaminadas con virus de la hepatitis A y calcivirus (Harris *et al.*, 2003),

frambuesas y moras congeladas contaminadas con *Cyclospora cayetanensis*, y mango congelado contaminado con *S. Typhi* (ICMSF, 2005). Es importante mencionar que aunque hoy en día este tipo de productos son denominados de bajo riesgo, la falta de información sobre la frecuencia y el comportamiento de microorganismos patógenos en dichos productos proporcionan incertidumbre sobre la inocuidad de los mismos.

2.1.4 Fuentes y mecanismos de contaminación

Durante el procesamiento de hortalizas congeladas estas se pueden contaminar por diversos patógenos a través de las diferentes etapas de producción. Muchos de los patógenos presentes se pueden encontrar en la materia prima. La contaminación de hortalizas con patógenos puede ocurrir durante cualquier etapa de producción del campo a la mesa, incluyendo las semillas, cultivo, cosecha y poscosecha (Sapers *et al.*, 2006).

Algunas fuentes potenciales de contaminación en la precosecha son: el suelo, las heces de animales o/y humanos, agua de riego, el agua utilizada para aplicar fungicidas e insecticidas, polvo, insectos, composta, animales salvajes y domésticos y el hombre. Durante la poscosecha se incluyen: el hombre, equipos de recolección, contenedores, agua de lavado, hielo, empaque, vehículos de transporte y procesamiento (Burnett y Beuchat, 2001). También diversas fuentes pueden estar involucradas durante la violación de buenas prácticas de higiene en restaurantes, comedores y en los hogares (Sapers *et al.*, 2006) que pongan en riesgo la inocuidad del producto.

Diversos estudios toman como punto clave al manejo poscosecha como un factor que contribuye a la presencia de patógenos en hortalizas (Aguado *et al.*, 2001). Las superficies y los equipos de procesamiento juegan un papel muy importante en la contaminación, ya que diversos patógenos tiene la capacidad de adherirse a diversas superficies inertes formando biopelículas, las cuales

proporcionan una protección ante los germicidas (Thévenot *et al.*, 2006). Algunos equipos dentro de las líneas de producción son más susceptibles a la persistencia de patógenos y por lo mismo es difícil de eliminarlos, ya que las bacterias se pueden alojar en espacios muy pequeños de los equipos en donde es imposible o se dificulta el lavado. De esta manera dentro de una empresa se pueden encontrar puntos de peligro o sitio donde los patógenos se pueden alojar con facilidad y detonar la contaminación cruzada (Thévenot *et al.*, 2006). Uno de los equipos más empleados en el procesamiento de alimentos y que se ha visto como un nicho potencial de patógenos como *L. monocytogenes* son las cortadoras ya que como se acaba de mencionar, cuenta con lugares inaccesibles para los desinfectantes y por lo tanto pueden propiciar la colonización microbiana (Lianou y Sofos, 2007). *L. monocytogenes* es uno de los principales patógenos de importancia en este tipo de plantas procesadoras, debido a que es una bacteria ubicua, por lo que es fácil que contamine el producto (Thévenot *et al.*, 2006).

También diversas fuentes pueden estar involucradas durante la violación de buenas prácticas de higiene en restaurantes, comedores y en los hogares (Sapers *et al.*, 2006) que pongan en riesgo la inocuidad del producto.

2.1.5 Persistencia de patógenos en plantas procesadoras de hortalizas congeladas

Uno de los principales problemas de la industria procesadora de alimentos incluida la de hortalizas congeladas es la persistencia de patógenos dentro de las plantas. Algunas de las hipótesis que se han desarrollado para explicar la permanencia de estos microorganismos son (Ferreira *et al.*, 2014):

- Adaptación física a diversos factores durante el proceso de producción
- Adherencia a superficies de contacto

2.1.5.1 Adaptación física a diversos factores

Los microorganismos en los alimentos pueden sufrir daños como consecuencia de los procesos a los que son sometidos, tales como: tratamientos

térmicos, refrigeración, congelación, secado, irradiación, adición de conservadores, acidificación y disminución de la actividad de agua, entre otros (Wu, 2008) (Figura 2). En el caso de los vegetales congelados, el daño a los patógenos ocurre principalmente durante la congelación y en el escaldado. El daño generado a los microorganismos por los diferentes tratamientos a los que son sometidos puede condicionar su sobrevivencia y proliferación en dichos productos.

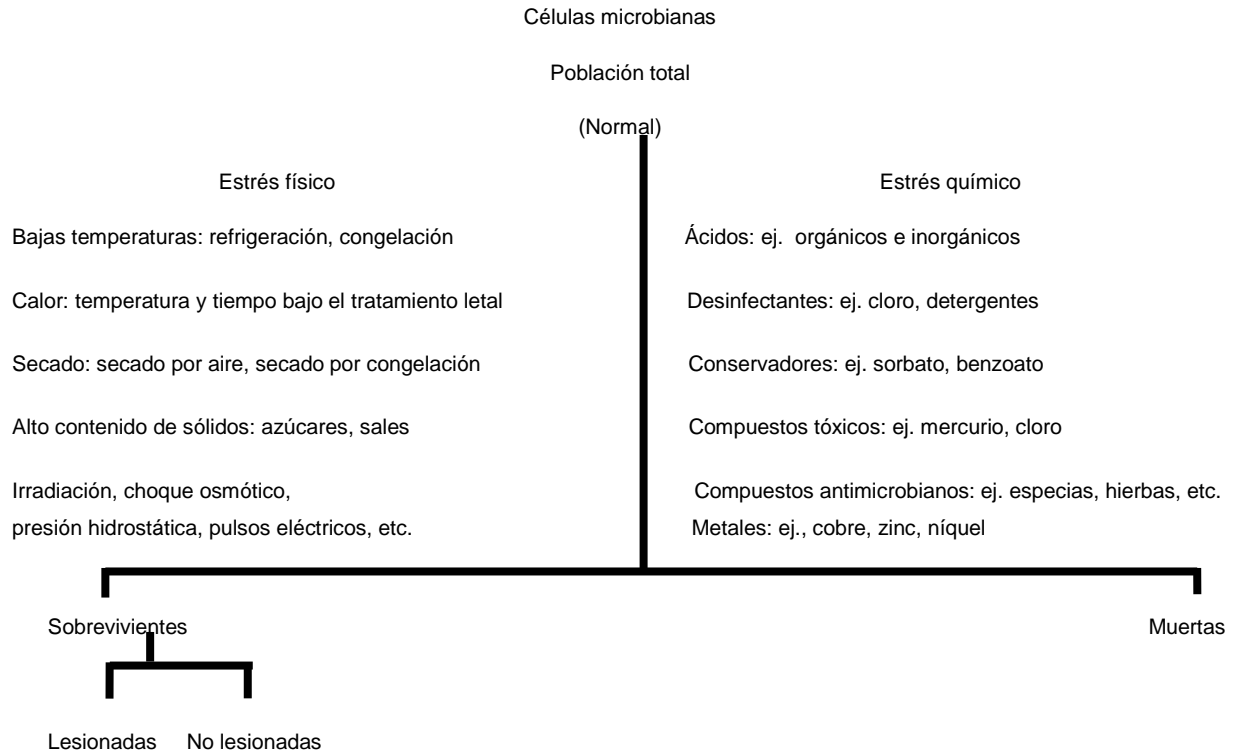


Figura 2. Efecto de tratamientos subletales sobre células microbianas (Wu, 2008).

El estrés generado hacia los microorganismos varía en magnitud y efecto (Figura 3). El término “estrés ligero” es usado para describir niveles de estrés subletal que no afectan la pérdida de viabilidad, pero reducen o detienen el

crecimiento microbiano. El “estrés moderado”, se usa para describir aquel tipo de estrés que no sólo se detiene el crecimiento microbiano, sino también causa una pérdida en la viabilidad de la célula; por último el “estrés severo” describe aquel estrés en el que resulta en la muerte de la mayoría de la población (Yousef y Juneja, 2003).

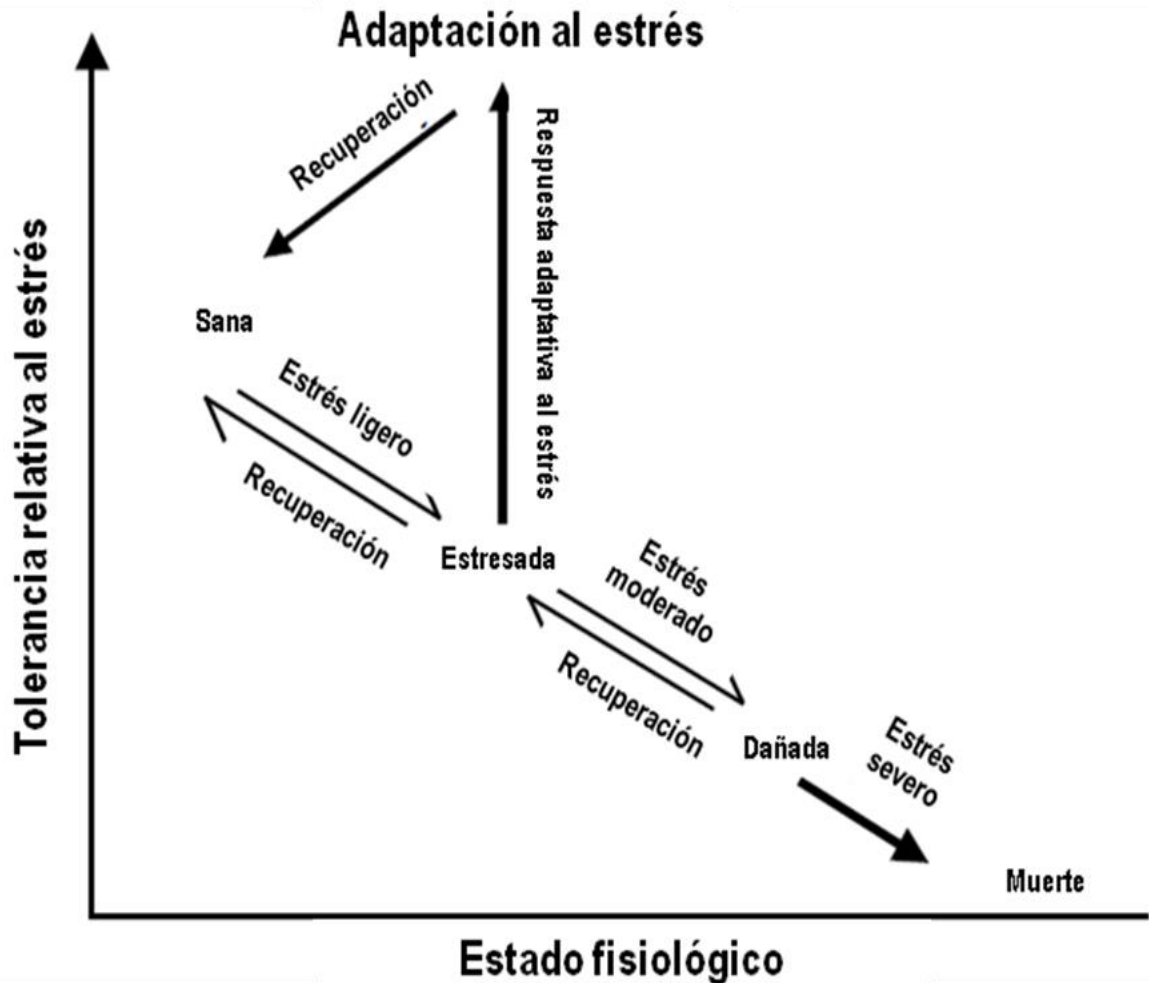


Figura 3. Relación entre el estado fisiológico de las células microbianas y el tipo de estrés al que fueron expuestas (Yousef y Juneja, 2003).

Después de que los microorganismos son sometidos a un daño subletal, muchos componentes estructurales y funcionales de la célula son afectados tales como: la pared celular, la membrana citoplasmática, los ribosomas, el ADN, el ARN, así como muchas enzimas (Wu, 2008).

El efecto del estrés sobre los microorganismos va a depender tanto del factor e intensidad de estrés como del microorganismo en cuestión. En el caso de la congelación, este tratamiento no afecta de igual manera a hongos, levaduras, virus y bacterias. En el caso de bacterias patógenas, las bacterias Gram negativas (*Salmonella* spp., *E. coli*, etc.) son más susceptibles a la congelación que bacterias Gram positivas (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, etc.), ya que el daño se ve atribuido principalmente a la formación de cristales intracelulares (Sinha *et al.*, 2012), siendo menor en estas últimas porque cuentan con pared celular la cual es una barrera de protección adicional con la que no cuentan las bacterias Gram negativas.

Cuando los microorganismos son estresados, generan una respuesta para adaptarse. El fenómeno llamado “endurecimiento al estrés” o “respuesta adaptativa al estrés”, se refiere a la capacidad del microorganismo de generar mayor resistencia a factores letales después de la adaptación a las tensiones ambientales, lo cual puede contrarrestar la eficacia de los métodos de conservación y comprometer la inocuidad alimentaria (Lou y Yousef, 1997; Koutsoumanis *et al.*, 2003).

La adaptación al estrés es un fenómeno complejo el cual depende del tipo de estrés al cual sea sometido un microorganismo y al tipo de microorganismos (Yoysef y Juneja, 2003). La respuesta de adaptación al estrés implica la inducción de mecanismos genéticos y fisiológicos, entre los cuales se incluyen (Sapers *et al.*, 2006):

- Síntesis de proteínas protectoras, que participan en la reparación del daño celular o en la supresión de agentes de estrés.
- Aumento temporal de la resistencia a factores letales.
- Transformación de las células a un estado latente (formación de esporas o la inducción del estado viable pero no cultivable).
- La evasión de mecanismos de defensa del hospedero.
- Mutaciones adaptativas.

En el caso del estrés generado por calor, éste induce la síntesis de proteínas chaperonas que ayudan al plegamiento y ensamblaje de las proteínas dañadas por el calor o proteasas ATP-dependientes que degradan proteínas dañadas, conocidas como proteínas de choque térmico. En el caso de estrés por frío, algunos cambios que ocurren en respuesta a este estrés son los cambios en la composición de ácidos grasos para promover la fluidez de la membrana, la síntesis de proteínas clasificadas como proteínas de choque del frío y proteínas de aclimatación al frío. Cuando las bacterias son sometidas a algún tipo de estrés ácido, responden modificando la composición de la membrana, incrementando el flujo de protones, aumentando el catabolismo de aminoácidos e induciendo enzimas reparadoras del ADN (Lou y Yousef, 1996).

Sí existen células que tengan la capacidad de adaptarse al estrés dentro de plantas procesadoras, estas podrían sobrevivir y llegar a permanecer más tiempo respecto a aquellas que no tienen la capacidad de adaptarse. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que la capacidad de adaptación al estrés no es el único factor que puede contribuir a dicha permanencia. Lundén *et al.* (2008) encontró que las cepas persistentes dentro de una planta procesadora de alimentos tenían una mayor tolerancia a la acidez que las esporádicas, sin embargo no observaron una diferencia significativa en la tolerancia al calor.

2.1.5.2 Adherencia a superficies de contacto

La adherencia bacteriana es un fenómeno que se genera cuando una célula activa se deposita sobre una superficie orgánica o inorgánica. La finalidad de la adherencia a una superficie es conducir a la bacteria a sobrevivir y reproducirse dentro de su hospedero (Rocha *et al.*, 2004). El proceso de adherencia de las bacterias es un proceso físico-químico muy complejo, algunos mecanismos involucrados en este proceso son las interacciones electrostáticas, las interacciones hidrofóbicas y las estructuras bacterianas superficiales (Patel *et al.*, 2011). La adhesión bacteriana evoluciona en dos etapas: inicialmente ocurre una interacción reversible que se da por interacciones de Van der Waals, puentes de hidrógeno,

interacciones hidrofóbicas y enlaces iónicos; posteriormente se origina una adhesión irreversible, esta sucede cuando la célula bacteriana que se encuentra adherida a la superficie, comienza a sintetizar y excretar polímeros formando biopelículas en las cual las bacterias se encuentra embebida (Costerton *et al.*, 1987; Matthysse, 1992).

Las biopelículas pueden definirse como “una matriz cerrada de poblaciones bacterianas adheridas entre sí y/o a superficies o interfaces” (Costerton *et al.* 1995). Otros autores la definen como una matriz metabólicamente activa de células y compuestos extracelulares (Kumar and Anand, 1998). Las biopelículas ayudan a la persistencia microbiana dentro de ambientes no favorables debido a que proveen versatilidad fenotípica y ventajas ecológicas, incluyendo: protección del ambiente conferido por la matriz extrapolimérica, mejor disponibilidad de nutrientes y cooperación metabólica, transferencia de genes (Davey y O’Toole, 2000).

Borucki *et al.* (2003) comparo la formación de biopelículas en PVC de cepas esporádicas y persistentes de *L. monocytogenes*, encontrado que estas últimas tenían una producción más alta y significativa de estas. Sin embargo al igual que en la adaptación al estrés no es el único factor que influye en la persistencia de una cepa en un ambiente, encontrándose otros estudios como el de Djordjevic *et al* (2002) que no existía una diferencia en la producción de biopelículas entre cepas persistentes y esporádicas de *L. monocytogenes*.

2.2 *Listeria monocytogenes*

2.2.1 Características generales

Una de las bacterias patógenas que se reporta frecuentemente en productos hortofrutícolas es *L. monocytogenes* (Heaton y Jones, 2007; Ágoston, 2009; Issa-Zacharia *et al.*, 2010). Debido a su capacidad para sobrevivir a temperaturas de congelación es un patógeno importante a tomar en cuenta en hortalizas congeladas. Esta bacteria es un cocobacilo, Gram-positivo, psicrótrofo, móvil, no esporulado,

anaerobio facultativo, patógeno de origen alimentario en humanos y animales y con una amplia distribución en la naturaleza (Torres *et al.*, 2005).

La clasificación taxonómica de *L. monocytogenes* es: Dominio: *Bacteria*, filo: *Firmicutes*, clase: *Bacilli*, orden: *Bacillales*, familia: *Listeriaceae*, genero: *Listeria*. Hasta el año 2007, se conocían seis especies de *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* (subsp. *ivanovii* y *londoniensis*), *L. seeligeri*, *L. grayi* y *L. welshimeri*, sin embargo en 2010 *L. marthii* es validada como especie y tiempo después *L. rocourtiae* (Marco, 2012).

Este patógeno es adquirido por el consumo de alimentos contaminados o por el contacto con mucosas de animales infectaos, causando listeriosis, una enfermedad invasiva que involucra complicaciones muy serias como meningitis, septicemia e infecciones perinatales, que pueden llevar hasta la muerte (Farber y Peterkin, 1991). Las graves manifestaciones clínicas características de esta enfermedad hacen que aunque sea una enfermedad infecciosa de baja morbilidad, presente una alta letalidad, con tasas que van de 13 a 34%, las más altas de todas las infecciones alimentarias. La listeriosis humana puede presentarse como brotes o en forma de casos esporádicos y es fundamentalmente una infección de carácter oportunista que afecta sobre todo a mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y adultos inmunodeprimidos, incluyendo a los afectados de SIDA (López *et al.*, 2006). Hay dos tipos de listeriosis asociados con *L. monocytogenes*, la no invasiva y la invasiva. La primera muestra síntomas que van de leves a moderados, se refiere a menudo como gastroenteritis febril (diarrea, fiebre, dolor de cabeza y dolor muscular) y es causada por la ingestión de una dosis alta del patógeno por personas inmunocomprometidas, además que su período de incubación es más corto (20 hrs) que el de la listeriosis invasiva. Sin embargo, la listeriosis más común es la invasiva, que presenta diversas manifestaciones dependiendo el sistema que infecte. Puede ocasionar septicemia, endocarditis, abscesos, lesiones en la piel, conjuntivitis y en el caso de las mujeres embarazadas puede generar abortos espontáneos. Este tipo de enfermedad afecta a personas de alto riesgo con dosis bajas. Su periodo de incubación es variable y va de tres a 70 días (López *et al.*, 2006; Kataoka, 2011).

2.2.2 Mecanismo invasivo de infección

El ciclo de infección comienza con la adhesión de *L. monocytogenes* a la superficie la célula eucariota y la subsecuente penetración de la bacteria dentro de la célula hospedadora mediante fagocitosis. Las proteínas internalina (InIA) y la proteína InIB, codificadas ambas por el operón *inIAB*, ayudan a la adhesión del patógeno; la primera interviene en la adhesión e invasión de células epiteliales polarizadas, como las intestinales, mientras que InIB lo hace en el caso de células epiteliales no polarizadas, como los hepatocitos. Existen muchas otras moléculas necesarias para la invasión y/o entrada de *L. monocytogenes* en la célula eucariota, entre las que se encuentran varias autolisinas (Ami, p60, Auto), una proteína fijadora de fibronectina (FbpA) y proteínas que también intervienen en fases posteriores del ciclo intracelular, como ActA y la hemolisina o listeriolisina O (LLO). Una vez fagocitada, la bacteria es capaz de escapar del ambiente hostil del fagosoma gracias a la secreción de LLO, y las fosfolipasas PI-PLC y PC-PLC. Posteriormente en el citoplasma se multiplica utilizando el transportador de hexosa-fosfato Hpt y se mueve gracias a la polimerización de actina dirigida por ActA. Finalmente, algunas bacterias que alcanzan la periferia de la célula infectada, entran en contacto con la membrana celular y forman protuberancias hacia la célula colindante en forma de evaginaciones citoplásmicas que contienen en su extremo una bacteria. Estas estructuras invasoras son fagocitadas y la bacteria queda encerrada en un fagosoma de doble membrana, en cuya ruptura la lectinasa juega un papel fundamental. Al ser un mecanismo que permite la diseminación de la bacteria por los tejidos del hospedador sin entrar en contacto con los efectores humorales del sistema inmune, es un fenómeno crucial en la patogénesis de *L. monocytogenes* (López *et al.*, 2006) (Figura 4).

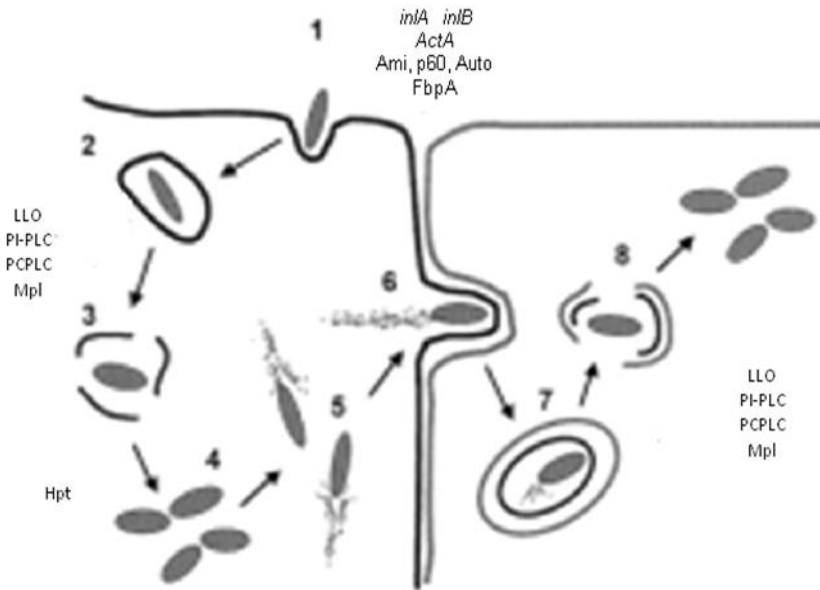


Figura 4. Representación esquemática del ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes* (López et al., 2006). 1) Adhesión a la célula eucariota en la que intervienen proteínas (InlA ó InlB, ActA, FbpA) y autolisinas (Ami, p60 y Auto). 2) La bacteria penetra en la célula eucariota induciendo su propia fagocitosis. 3) La bacteria escapa del fagosoma por la acción de la hemolisina LLO y las fosfolipasas PI-PLC y PC-PLC. 4) En el citoplasma se multiplica utilizando el transportador de hexosa-fosfato Hpt. 5) La bacteria se mueve por polimerización de actina (ActA). 6) Pasa a células contiguas. 7) Forma un fagosoma de doble membrana. 8) Lisa el fagosoma reiniciando el ciclo.

2.2.3 Virulencia

Muchas cepas de *L. monocytogenes* tienen un alto potencial patogénico, sin embargo algunas poseen una baja capacidad para establecer la infección y son relativamente avirulentas (Lui *et al.*, 2003). En los últimos años se ha identificado un gran número de factores de virulencia involucrados en los pasos clave de su ciclo de vida intracelular. La virulencia de *L. monocytogenes* es por lo tanto una propiedad multifactorial y al menos nueve genes y sus productos son necesarios para la infección, la invasión, la supervivencia, la movilidad y la difusión de célula a célula (McLauchlin *et al.*, 2004). Los factores de virulencia que son producidos por esta bacteria para facilitar el proceso invasivo se deben a los genes *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*, los cuales están organizados en una isla cromosomal de 9 kb conocida como grupo de genes de virulencia PrfA dependientes, denominada isla 1 de

patogenicidad de *Listeria* (LIP1-1) (López *et al.*, 2006). La proteína reguladora PrfA es absolutamente indispensable para la expresión de la virulencia en las especies patógenas de *Listeria* (Torres *et al.*, 2005). La adaptación de *L. monocytogenes* al estrés provocado por las condiciones ambientales o por el procesado y conservación de los alimentos en la industria (temperaturas extremas, falta de nutrientes, acidez) pueden provocar cambios en la célula bacteriana que, por un lado, dificultan la detección de las células dañadas sub-letalmente y, por otro, pueden afectar su virulencia (López *et al.*, 2006).

2.2.4 Sobrevivencia y desarrollo

La amplia distribución de *L. monocytogenes* en el ambiente se debe a la capacidad de sobrevivir durante periodos de tiempo prolongados en diferentes medios y a que está presente en bajo número en muchos materiales del ambiente (Torres *et al.*, 2005).

Este patógeno es tolerante a condiciones extremas de pH, temperatura y salinidad (Lui, 2006); se ha reportado sobrevivencia de este patógeno en congelación (- 18°C) durante varias semanas en varios alimentos (Kudsen *et al.*, 2001; Flessa *et al.*, 2005; Marco, 2006). Su desarrollo en alimentos depende de las características intrínsecas de los productos (pH, actividad de agua), de las características extrínsecas (temperatura de almacenamiento, humedad relativa) y las características intrínsecas del microorganismo (estado fisiológico, número). En el Cuadro 2 se muestran los límites de crecimiento y sobrevivencia para *L. monocytogenes* (FSAI, 2005).

Cuadro 2. Límites de crecimiento y sobrevivencia de *L. monocytogenes*

Variables	Desarrollo			Sobrevivencia (no desarrollo)
	Mínimo	Máximo	Óptimo	
Temperatura (°C)	-1.5 a 3	45	30 a 37	-18

pH	4.2 a 4.3	9.4 a 9.5	7.0	3.3 a 4.2
Actividad de agua	0.90 a 0.93	> 0.99	0.97	<0.90
Sal (%)	< 0.5	16	N/A	>20

(FSAI, 2005)

2.2.5 Efecto de los tratamientos térmicos y congelación

La resistencia de *L. monocytogenes* al calor en los alimentos es muy variable. Se ha estudiado exhaustivamente la resistencia al calor de este patógeno tanto en medios de cultivo como en alimentos, y los resultados sugieren que depende de la edad del cultivo, condiciones de crecimiento, los medios de recuperación y las características de los alimentos (contenido de sal, actividad de agua, acidez, presencia de inhibidores) (Ágoston, 2009).

Los efectos de la congelación y el almacenamiento en congelación en la sobrevivencia y crecimiento de *L. monocytogenes* también ha sido extensamente estudiados, la mayoría de estos estudios confirman que la matriz alimentaria protege a este patógeno durante la congelación y el posterior almacenamiento. Aunque estos procesos pueden reducir la cantidad y la viabilidad de *L. monocytogenes*, los procesos son más propensos a lesionar y/o sensibilizar las células que a destruirlas (FSAI, 2005). La capacidad *L. monocytogenes* para revertir los daños generados por la congelación contribuye a que las hortalizas congeladas sean una potencial vehículo e este patógeno.

2.2.6 Persistencia dentro de plantas procesadoras

La persistencia de *L. monocytogenes* en ambientes asociados a los alimentos se encuentra bien documentada, sin embargo no entendida del todo. Diversos estudios llaman a cepas como persistentes cuando estas son recuperadas de dos o más muestreos diferentes realizados durante el tiempo (Ferreira *et al.*, 2004).

Muchas hipótesis señalan que la persistencia de *L. monocytogenes* esta influida por su capacidad de adaptación a diversos tipos de estrés, así como a su formación de biopelículas (Ferreira *et al.*, 2004). En el caso de la adaptación, se ha observado que la exposición de *L. monocytogenes* a la inanición, etanol, peróxido de hidrógeno y a una elevada acidez, aumenta significativamente la resistencia al calor (Lou y Yousef, 1996). Hill *et al.* (2002) encontraron que células de *L. monocytogenes* adaptadas al estrés ácido pueden sobrevivir por más tiempo en un medio ácido (pH 3.5) que aquellas que no han sido expuestas previamente. Por otra parte se ha comprobado que este patógeno puede adaptarse a los compuestos cuaternarios de amonio, que son compuestos ampliamente utilizados en la industria de procesamiento de alimentos, así como generar una adaptación cruzada a diversos desinfectantes (Lundén *et al.*, 2003).

En algunos estudios se ha observado que cepas de *L. monocytogenes* que persisten en la industria tienen una mayor producción de biopelícula que las cepas esporádicas (Borucki *et al.*, 2003). Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias entre la adherencia y formación de biopelículas entre estos dos tipos de cepas (Djordjevic *et al.*, 2002). Esto revela que la persistencia de este patógeno en la industria no sólo es dependiente de una característica como la formación de biopelículas. Sería necesario realizar el estudio de los diversos factores que pudieran influir en la prevalencia del patógeno en las plantas de alimentos, así como las posibles interacciones entre ellos.

2.3 Medidas de control para evitar enfermedades por consumo de frutas y hortalizas congeladas

Los brotes de enfermedades causadas por el consumo alimentos, incluidos los vegetales congelados son un suceso trágico desde un enfoque tanto del sector salud como económico, por lo cual es necesaria la implementación de diversos procesos que permitan mantener la inocuidad de dichos productos durante toda la cadena de producción. Entre las estrategias empleadas se encuentran:

- La cuantificación de microorganismos índice

- La trazabilidad de la contaminación
- La implementación de programas de control

2.3.1 Microorganismos índices

Debido a que la detección de patógenos tiene algunas limitantes como son la baja concentración del mismo, heterogeneidad en las muestras, el alto costo y tiempo requerido de los análisis, se emplea el uso de microorganismos índice.

El término “microorganismo índice” ha sido introducido como microorganismos marcadores cuya presencia en cantidades o niveles encima de ciertos límites numéricos indica la posible presencia de patógenos ecológicamente similares (Mossel *et al.*, 1995). La detección de un microorganismos índice en alimentos provee la evidencia que lo relaciona con la posible presencia de un patógeno (Busta *et al.*, 2003). Algunas características que debe tener un microorganismo índice son las siguientes:

- Fácil detección
- Mayor homogeneidad en la muestra que los patógenos
- Bajo costo de análisis
- Practicidad de análisis
- Alta correlación con la presencia de patógenos
- Ausencia o baja concentración en ausencia del patógeno
- Similar resistencia a condiciones ambientales y tratamientos que los patógenos a los cuales representa.

En el caso de *L. monocytogenes* debido a que es un microorganismo ubicuo hasta el momento no se han encontrado microorganismos índices para predecir su presencia. En algunos estudios se ha encontrado que *Listeria* spp. indica de manera potencial la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Sin embargo otros autores no han encontrado relación entre el generó y la especie patogénica (Hoffman *et al.*, 2002; Linau and Sofos, 2007).

2.3.2 Trazabilidad

La implementación de muestreos son medidas que se utilizan para localizar nichos potenciales de contaminación, así como identificar qué tipo de agente(s) patógeno(s) se encuentran en determinado producto o superficie. Diversas investigaciones de brotes ilustran que no existe solamente un punto de contaminación hacia el producto final dentro de la cadena de producción de alimentos (Lianou y Sofos, 2007), por lo cual es necesaria la trazabilidad de la contaminación para identificar los nichos y las vías de transmisión de la contaminación, y así generar estrategias para el control y prevención de la misma (Muriel, 2011). Una herramienta empleada para trazar la contaminación es la tipificación de cepas patógenas, lo que ayudaría a saber de donde provienen la cepas que se están encentrando en el producto final. En la actualidad los métodos de tipificación molecular son más empleados ya que tienen una mayor capacidad de discriminación comparado con los métodos fenotípicos.

Algunas de las técnicas más utilizadas para la subtipificación molecular son: ribotipificación, amplificación del polimorfismo de la longitud de fragmentos (AFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) (Paciorek *et al.*, 2006). Los métodos antes mencionados están basados en la generación de patrones de bandas y su comparación en formato de imagen (Vázquez y Berrón, 2004), siendo este último el más empleado.

2.3.3 Programas control

Los programas control buscan evitar la contaminación del producto terminado por agentes patógeno de naturaleza microbiana que puedan comprometer la inocuidad de los alimentos. La implementación correcta de estos programas es la base para la obtención de productos inocuos.

2.3.3.1 Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)

La calidad final de los vegetales congelados depende en gran parte de la calidad del producto fresco, por lo cual es necesario implementar estrategias para prevenir la contaminación de estos productos desde el campo.

Las BPA son "prácticas orientadas a la sostenibilidad ambiental, económica y social para los procesos productivos de la explotación agrícola que garantizan la calidad e inocuidad de los alimentos y de los productos no alimenticios" (COAG FAO, 2003). Estas prácticas se centran en las medidas que previenen los peligros físicos, químicos y biológicos dentro de los terrenos de cultivo, cosecha y transporte de productos frescos.

2.3.3.2 Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)

Las BPM son una herramienta básica para la obtención de productos seguros para el consumo humano, que se centraliza en la higiene y forma de manipulación durante la producción del alimento. A continuación se enlistan sus objetivos principales (Sánchez, 2008):

- Son útiles para el diseño y funcionamiento de los establecimientos y para el desarrollo de procesos y productos relacionados con la alimentación.
- Contribuye al aseguramiento de una producción de alimentos inócuos y saludables para el consumo humano.
- Son indispensables para la aplicación del HACCP, de un sistema de Gestión de Calidad Total (TQM) o de un Sistema de Calidad.

2.3.3.3 Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP)

Para verificar el control de BPA y BPM, los procesadores de alimentos han utilizado tradicionalmente pruebas de producto final, con la finalidad de evaluar la calidad microbiológica e inocuidad de sus alimentos. Las pruebas microbiológicas se llevan a cabo en un número determinado de muestras recogidas de un lote del producto, la cual debe de ser representativa. Sin embargo, la evaluación de un

producto alimenticio terminado no es garantía de inocuidad, ya que en el sistema de muestreo una gran producción de unidades escapan a la detección, por lo cual es necesario aplicar un enfoque más centrado hacia el control del proceso como la implementación del programa de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés). El HACCP es una herramienta que ayuda a la identificación, evaluación y control de peligros y su control durante proceso de producción de alimentos (Laminkanra, 2002; Sapers *et al.*, 2006). El diseño, la implementación y el mantenimiento de HACCP no es fácil y requiere un fuerte apoyo de la alta dirección. El compromiso de los recursos humanos y monetarios es necesario para que el sistema funcione.

3 JUSTIFICACIÓN

El incremento de las enfermedades transmitidas por el consumo de hortalizas es un problema grave ya que conlleva pérdidas económicas y humanas, por lo cual es importante que las industrias dedicadas a la producción de hortalizas frescas, mínimamente procesadas y procesadas, tomen medidas para evitar que patógenos lleguen a estos productos. *L. monocytogenes* es uno de los patógenos más importantes a estudiar por su ubicuidad y por la severidad de la enfermedad que ocasiona.

Hoy en día por un lado existe una demanda importante en la producción de hortalizas congeladas y por otro una pobre información sobre *L. monocytogenes* en este tipo de productos, es indispensable generar información sobre la incidencia, distribución, comportamiento y relación de *L. monocytogenes* con otras bacterias durante el procesamiento de este tipo de productos. La finalidad de este proyecto fue generar una vinculación con la industria, para tratar de llenar aquellos vacíos en la información, lo que le permitirá a la empresa con bases científicas controlar y prevenir la contaminación de sus productos por *L. monocytogenes*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Investigar la incidencia y distribución de *L. monocytogenes* a lo largo del proceso de producción de hortalizas congeladas, establecer la relación que tiene este patógeno con microorganismos indicadores y evaluar sus características intrínsecas que le permiten prevalecer en la planta procesadora.

4.2 Objetivos específicos

- Establecer la incidencia y distribución de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en una planta procesadora de hortalizas congeladas.
- Caracterizar molecularmente las cepas de *L. monocytogenes* aisladas a lo largo del proceso de producción
- Evaluar la relación que existe entre microorganismos indicadores, *Listeria* spp. y la presencia de *L. monocytogenes* dentro de la planta procesadora de hortalizas congeladas.
- Evaluar el efecto de la adaptación al sustrato de cepas de *L. monocytogenes* aisladas en la industria de hortalizas congeladas sobre su desarrollo y formación de biopelículas.
- Evaluar el efecto de la adaptación al sustrato de cepas de *L. monocytogenes* en la resistencia a tratamientos de desinfección y escaldado.

5 METODOLOGÍA

5.1 Incidencia y distribución de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en un planta procesadora de hortalizas congeladas

5.1.1 Muestreos durante el proceso de producción

Este estudio se realizó en colaboración con una empresa procesadora de hortalizas congeladas. Como primer paso se realizó una evaluación observacional dentro de la empresa con la finalidad de conocer las zonas en las que esta dividida y poder establecer los puntos de muestreo. Posteriormente se realizaron muestreos longitudinales y transversales durante más de un año (4 de septiembre del 2012 al 6 de diciembre del 2013), tomándose tres diferentes tipos de muestras: producto, superficie de contacto directo con el producto y superficie de no contacto con el producto.

Las muestras de producto y agua que se recolectaron a lo largo de los muestreos se colocaron dentro de bolsas de plástico, y posteriormente en el laboratorio se extrajo una alícuota de 25 g ó mL. Las muestras de superficies se obtuvieron con una esponja estéril (Nasco Whil-Park, USA) previamente hidratada con 15 ml de caldo neutralizante (Difco, USA); se muestrearon aproximadamente 100 cm². Las muestras fueron transportadas desde la empresa hasta el laboratorio bajo condiciones de refrigeración y fueron analizadas inmediatamente.

En el Cuadro 3 se listan las muestras que se colectaron en la empresa durante los diferentes muestreos agrupadas por zona de producción y tipo de muestra.

Cuadro 3. Muestras colectadas durante el procesamiento de hortalizas congeladas

Zona de muestreo/Tipo de muestra	Descripción de la muestra		
	Producto	Superficie contacto directo	Superficie de no contacto
Corte	<ul style="list-style-type: none"> • Entrada • Después del corte 	<ul style="list-style-type: none"> • Caja de materia prima • Caja de producto cortado • Tabla de corte • Cuchillo • Guantes 	
Lavado y desinfección	<ul style="list-style-type: none"> • Después del lavado 	<ul style="list-style-type: none"> • Agua de recirculación • Banda transportadora de la tina de lavado • Tina de lavado 	<ul style="list-style-type: none"> • Patines del montacargas • Suelo • Coladera • Pala de recolección de residuos
Escaldado e IQF	<ul style="list-style-type: none"> • Saliendo del escaldado • Saliendo del IQF 	<ul style="list-style-type: none"> • Banda saliendo del escaldado • Banda saliendo del IQF 	<ul style="list-style-type: none"> • Escalera • Piso • Coladera

Línea de empaque 1 (Hayssen 1)	<ul style="list-style-type: none"> • Toten • Vibrador • Banda entre el vibrador y elevador • Inicio del elevador • Final del elevador Dosificador • Cono 	<ul style="list-style-type: none"> • Toten • Vibrador • Banda entre el vibrador y elevador • Inicio del elevador • Final del elevador • Dosificador • Cono 	<ul style="list-style-type: none"> • Coladera • Piso • Suela de zapato • Manguera de drenaje • Escalera
Línea de empaque 3 (Hayssen 3)	<ul style="list-style-type: none"> • Toten • Caída del toten antes del vibrador • Vibrador • Inicio del elevador • Final del elevador Dosificador • Cono 	<ul style="list-style-type: none"> • Palo mezclador • Toten • Caída del toten antes del vibrador • Vibrador • Inicio del elevador • Final del elevador Dosificador • Cono 	<ul style="list-style-type: none"> • Piso • Pared • Suela de zapato • Manguera de drenaje • Pala de recolección de residuos

5.1.2 Análisis microbiológicos

5.1.2.1 Cuantificación de microorganismos indicadores en superficies de contacto directo

Se realizaron recuentos de bacterias mesófilas aerobias (BMA), coliformes totales (CT) y bacterias ácido lácticas (BAL) en superficies de contacto directo con

el producto. Las muestras se homogenizaron y se prepararon diluciones decimales en diluyente de peptona 0.1% (Bioxon, México).

La cuantificación de BMA y CT se realizó empleando la técnica de vaciado en placa utilizando Agar Cuenta Estándar (ACE; Bioxon, México) y Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV; Bioxon, México), respectivamente. Las placas se incubaron a 35°C por 24 h. En el caso del recuento de BAL, se empleó la técnica de extensión en superficie en Agar de Man-Rogosa Sharp (MRS; Dibico; México), incubando las placas a 30°C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó a las colonias la prueba de Gram y catalasa.

5.1.2.2 Detección y aislamiento de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en los tres tipos de muestra

A partir de las muestras recolectadas se detectó la presencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* mediante el método del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés USDA) (USDA-FSIS, 2013). Se colocaron 25 g del producto en bolsas estériles (Nasco Whil-Park, USA) y se le adicionaron 225 ml de caldo de enriquecimiento primario University of Vermont Broth (UVM; Acumedia, USA). En el caso de las muestras de superficies se adicionaron 50 mL de UVM en la bolsa con la esponja que se empleó para el muestreo. Todas las muestras se homogenizaron en un homogenizador mecánico (Stomacher, Bag Mixer ® 400 Interscience Inc) por 1 min a velocidad media. Posteriormente se incubaron a 30°C por 24 h.

Finalizado el tiempo de incubación se transfirieron 100 µL de cada muestra a tubos con 10 ml de caldo de enriquecimiento secundario Fraser (Acumedia, USA) y se incubaron a 35°C por 48 h. Los cultivos de enriquecimiento secundario que resultaron positivos (observado por el oscurecimiento), se estriaron en placas de MOX (Acumedia, USA). Las colonias típicas de *Listeria* spp. se aislaron en cajas de agar soya tripticaseina (AST; Dibico, México) con 0.6% de extracto de levadura (Bioxon, México) (ASTEL). Finalmente para confirmar la presencia de *L. monocytogenes*, se realizaron pruebas bioquímicas de movilidad empleando el

medio SIM (Bioxon, México) y de fermentación de azúcares (manitol, ramnosa y xilosa) (Sigma-Aldrich, USA). Para complementar la identificación de *L. monocytogenes* también se realizó una prueba PCR, en la cual se detectó la presencia del gen *hlyA* que codifica para la Listeriosina O.

Para la prueba de PCR, de cada cepa aislada se extrajo su ADN mediante un paquete comercial de extracción de ADN (DNeasy Tissue & Blood kit®; Qiagen, USA) (Anexo 1). La pureza y la concentración del ADN extraído fue medida mediante un nanodrop (Thermo Scientific 2000c, USA).

Las condiciones de la PCR se observan en el Cuadro 4. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador Techne TC-512 (Techne, UK) y las fotos fueron capturadas en un fotodocumentador MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems, Israel). Los detalles de la optimización y estandarización del protocolo de PCR para la detección del gen *hlyA* (702 pb) mediante los primers LM1 y LM2 (Border *et al.*, 1990) se muestran en el Anexo 2.

Las cepas aisladas que mediante las características bioquímicas como moleculares fueron positivas para *L. monocytogenes* se almacenaron a -20 °C en caldo soya tripticasa (CST; Dibico, México) con 10 % de glicerol.

5.2 Tipificación molecular de cepas de *L. monocytogenes* aisladas dentro de la empresa

Las cepas de *L. monocytogenes* aisladas dentro de la planta procesadora de hortalizas congeladas fueron tipificadas molecularmente mediante la técnica de electroforesis en gel de campo eléctrico pulsado (PFGE por sus siglas en inglés) siguiendo el protocolo propuesto por el PulseNet (2013) con algunas modificaciones (Anexo 3).

Cuadro 4. Condiciones de PCR para la identificación de *L. monocytogenes* mediante el gen hly

Características del ADN	Características del gen	Características del los primers	Condiciones de mezcla		Condiciones de PCR	Condiciones de electroforesis
0.125- 0.8 ng/μL	Gen <i>hlyA</i> codifica para la proteína LLO con un peso molecular de 702 pb	(Sigma-Aldrich, México) LM1 (primer F) CCTAAGACGCCAATCGAA LM2 (primer R) AAGCGCTTGCAACTGCTC	TaKaRa Taq™ DNA Polymerase (Takara Shuzo Co. Ltd., Japan)		Desnaturalización inicial 94°C por 5 min. 25 ciclos 94°C por 30 s 60.5 °C por 25 s 72°C por 25 s Extensión final 72°C por 5 min	Gel de agarosa: 2% (p/v) de agarosa ultra pure (Invitrogen, USA) y 0.0028% (v/v) de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, USA) en TBE 1X (89mM base Tris, 89mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH=8.3).
			Reactivo	μL		
			10x buffer	1.25		
			2.5mM dNTP	1		
			primer F	0.5		
			primer R	0.5		
			Taq (0.75 U)	0.075		
			ADN (1:10)	2		
			H2O	7.68		
Total	13.005					

5.3 Relación entre *L. monocytogenes*, *Listeria* spp. y microorganismos indicadores

5.3.1 Relación entre *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*

Para conocer la relación entre la presencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en los tres tipos de muestra (producto, superficies de contacto directo y superficies de no contacto) se realizaron tablas de contingencia y a partir de ellas la prueba de Pearson. Se empleó el programa JMP versión 8.0 (SAS Institute, USA).

5.3.2 Relación entre *L. monocytogenes* y microorganismos indicadores en superficies de contacto directo

La relación entre *L. monocytogenes* y microorganismos indicadores (BMA, CT y BAL) en superficies de contacto directo se evaluó mediante una regresión logística empleando el programa JMP 8.0.

5.4 Efecto de la adaptación al sustrato de células de *L. monocytogenes* sobre su capacidad de desarrollo en extracto vegetal y la formación de biopelículas.

En la Figura 5 se observa el diagrama general del procedimiento que se siguió para evaluar el efecto de la adaptación al sustrato sobre el desarrollo y formación de biopelículas de las cepas seleccionadas de *L. monocytogenes*.

5.4.1 Selección de las cepas

De las cepas de *L. monocytogenes* aisladas durante los muestreos se realizó una selección para obtener las cinco cepas más tolerantes a ácido peracético y las cinco más susceptibles. Todas las cepas se activaron transfiriendo 40 µl de los cultivos mantenidos en congelación a tubos con 3 ml de CST y se incubaron durante 24 h a 35°C. Se realizaron otras dos transferencias sucesivas a la misma temperatura, pero incubando 19 h el último cultivo. Los cultivos celulares se lavaron

dos veces con solución salina isotónica estéril (SSI, NaCl 0.85%), centrifugando a 10,000 rpm durante 10 min y se resuspendieron en 3 mL de SSI. Posteriormente un mililitro de cada cepa se colocó en tubos con 9 mL de buffer de fosfatos a pH 7 conteniendo una concentración ácido peracético (PPA) (Bioxan, Italia) a 0 y 30 ppm, previamente valorada (Anexo 4). Trascorrido un minuto se les adicionó 1 mL de caldo neutralizante. El recuento de las células presentes en la suspensión se realizó mediante la técnica de vaciado en placa utilizando ASTEL; las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h. Se consideraron las cinco cepas más tolerantes y más susceptibles a aquellas que obtuvieron las menores y las mayores reducciones en la población durante el minuto de exposición al desinfectante, respectivamente (Anexo 5).

5.4.2 Preparación del extracto vegetal (EV)

Se cortaron 20 g de brócoli, coliflor y zanahoria naranja de manera separada en pequeños trozos y fueron mezclados. Posteriormente se realizó una dilución 1:10 (p/v) con agua potable y se homogenizó en un Stomacher a alta velocidad por tres minutos. La mezcla obtenida fue filtrada con papel filtro (Whatman, 180 mm) y esterilizada por filtración de membrana (0.45 µm). A esta suspensión de hortalizas en lo sucesivo se le denominará extracto vegetal (EV).

5.4.3 Preparación del inóculo de cepas adaptadas y no adaptadas al sustrato

La activación de las cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas se realizó transfiriendo 40 µL de los cultivos mantenidos en congelación a un tubo con 3 mL de CST y se incubaron durante 24 h a 35°C. Se realizaron dos transferencias sucesivas e independientes en CST y EV a la misma temperatura con la última transferencia incubada durante 19 h.

5.4.4 Desarrollo de células de *L. monocytogenes* (adaptadas y no al sustrato) en un extracto vegetal (EV)

El desarrollo de las cepas de *L. monocytogenes* se evaluó por medición indirecta de crecimiento (turbidez) en el equipo Bioscreen (LABSISTEMS FP-110C, Finlandia) . En cada pozo de una microplacas se colocaron 180 μ L del EV conteniendo 0, 15 y 30 ppm de ácido peracético. Posteriormente cada pozo se inoculó con 20 μ l de cada una de las suspensiones bacterianas ($\sim 1 \times 10^5$ UFC/ml). Como control positivo se empleó CST inoculado con cada una de las cepas de *L. monocytogenes* y como control negativo los sustratos (EV y CST) sin inocular. Las microplacas fueron colocadas a una temperatura de 25°C dentro del Bioscreen y el equipo se programó para tomar mediciones a una longitud de onda de 600 nm cada treinta minutos durante 24 h, con una agitación previa a la medición de 10 s. Los tratamientos se realizaron por triplicado. Con los valores obtenidos, se calculó la velocidad de desarrollo, fase Lag y densidad máxima alcanzada mediante el programa DMFit (www.combase.cc).

De manera simultánea se preparó otra microplaca y se almacenó en una incubadora bajo las mismas condiciones. Al inicio y después de 24 h se tomaron alícuotas para efectuar el conteo de las poblaciones microbianas por método tradicional. Se prepararon micro-diluciones en diluyente de peptona 0.1% y se empleó el método de recuento por vaciado en placa en ASTEL; las placas se incubaron a 25°C por 24 h.

5.4.5 Formación de biopelículas por células de *L. monocytogenes* (adaptadas o no al sustrato)

Las cepas seleccionadas se activaron como se describió en el apartado 5.3.3. La detección de biopelículas se realizó mediante la metodología propuesta por O'Toole (2011) con algunas modificaciones. En una microplaca se adicionaron 180 μ L de CST y EV con 0, 15 y 30 ppm de ácido peracético. Brevemente, cada pozo se inoculó con 20 μ L de la suspensión de cada una de las cepas del patógeno ($\sim 1 \times 10^5$ UFC/ml). Las microplacas se incubaron por 2 días a 25°C y 7 días a 4°C.

Transcurrido este tiempo se decantó la placa y se realizaron tres lavados sucesivos con 250 μ L de SSI. Posteriormente se adicionaron 250 μ L de metanol al 99% y se dejó actuar por 15 minutos; transcurrido el tiempo se decantó e y se adicionaron 200 μ L de cristal violeta 0.3% (Difco, USA), dejando reposar por 5 min. Nuevamente se realizaron tres lavados con 250 μ L de agua destilada. La placa se dejó secar y su contenido se solubilizó con 160 μ L de ácido acético glacial 30% (Golden Bell Reactivos, México). Se tomaron 100 μ L de la suspensión y se colocaron en una microplaca para Elisa y se realizó las lecturas a una longitud de onda de 590 nm en el equipo ELISA (Spectra Max, Molecular Devices, LL, USA). Los tratamientos se realizaron por triplicado.

5.4.6 Análisis estadístico

La velocidad de desarrollo (nm/h) y el incremento en el crecimiento (Log UFC/mL), en el caso de las cinéticas de desarrollo, así como la absorbancia (nm) en la formación de biopelículas fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se usó la prueba de Tukey para realizar la comparación de medias. Se empleó el programa JMP 8.0

5.5 Efecto de la adaptación al sustrato de células de *L. monocytogenes* en la resistencia a tratamientos de desinfección y escaldado

Para conocer el efecto de la adaptación a un sustrato, extracto vegetal, de células de *L. monocytogenes* sobre la capacidad para resistir tratamientos de desinfección y escaldado, se llevaron a cabo una serie de experimentos en el centro de investigaciones IRTA (Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias) en Lleida, España. Desafortunadamente no fue posible emplear las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la empresa de hortalizas congeladas.

5.5.1 Desarrollo de *L. monocytogenes* en el extracto vegetal (EV¹)

5.5.1.1 Preparación del extracto vegetal (EV¹)

Se pesaron cantidades equivalentes de muestras de brócoli, coliflor y zanahoria naranja. Se realizó una dilución 1:10 (p/v) con agua desionizada, homogenizando la mezcla con un extractor (Robot Coupe, Press Culis C40). Posteriormente el extracto fue esterilizado por calor a 110°C por 10 min. Debido a las diferencias en el procedimiento de preparación (extracción y esterilización) del EV con respecto al preparado en los experimentos realizados en México, a este extracto se le denominará EV¹.

5.5.1.2 Cepas

Se emplearon cinco cepas de colección de *L. monocytogenes*: *L. monocytogenes* 230 (serovar 1/2a), *L. monocytogenes* CECT 4031 (serovar 1a), *L. monocytogenes* CECT 4032 (serovar 4b), *L. monocytogenes* CECT 933 (serovar 3a) y *L. monocytogenes* CECT 940 (serovar 4d).

5.5.1.3 Preparación del inóculo

Las cepas fueron estriadas de manera independiente en agar soya tripticasa (Biokar Diagnostics, Francia) adicionado con 6 g/L de extracto de levadura, 2.5 g/L de glucosa y 2.5 g/L de fosfato dipotásico (ASTEL¹) e incubadas a 35°C por 24 h. Posteriormente se picó una colonia de cada caja y se colocó en tubos con 5 mL en caldo soya tripticasa (Biokar Diagnostics, Francia) adicionado con 6 g/L de extracto de levadura (CSTEL) y EV¹ de manera independiente. Se incubaron los tubos a 35°C por 24 h. Trascurrido el tiempo de incubación las cepas se mezcladas y se centrifugaron a 9800xg durante 10 min y se re-suspendieron en SSI.

5.5.1.4 Comportamiento de *L. monocytogenes* en CSTEL y EV¹

Se inocularon tres tubos de CSTEL y tres de EV¹ con la mezcla bacteriana (~1x10³ UFC/mL). Los tubos se incubaron a 25 y 4 °C durante 28 h y 9 días, respectivamente. Durante el tiempo de incubación se tomaron alícuotas de los

medios de cultivo para efectuar el recuento de las poblaciones en placas de agar PALCAM (Palcam Agar Base con suplemento selectivo, Biokar Diagnostics, Francia); las placas se incubaron a 35°C durante 48 h.

5.5.2 Tratamientos de desinfección y escaldado

En la Figura 6 se muestra el diagrama de flujo de las muestras de brócoli, de esa manera se realizaron las otras dos muestras modificando únicamente, el tiempo y temperatura de escaldado.

5.5.2.1 Preparación de las muestras e inoculación

El día previo al experimento, muestras de brócoli, coliflor y zanahoria anaranjada se adquirieron en un mercado local y se almacenaron en refrigeración (4°C). El brócoli y la coliflor se cortaron en porciones de 10 g, mientras que la zanahoria fue pelada manualmente y cortada en tiras gruesas de 5 g cada una. Las muestras se inocularon por inmersión durante 2 min con agitación (100 rpm) en 2 L de la suspensión bacteriana ($\sim 1 \times 10^7$ UFC/mL). Las muestras se secaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizó el recuento inicial por triplicado empleando 90 mL de agua de peptona (APT; Diagnostics, Francia) como diluyente y PALCAM como medio de recuento. Las placas fueron incubadas a 35°C por 48h.

5.5.2.2 Desinfección de hortalizas frescas inoculadas con *L. monocytogenes*

Las muestras inoculadas se sumergieron en una solución desinfectante con 63 ppm de ácido peracético¹ (Fluka, España) previamente valorada (Anexo 6) a diferentes tiempos de exposición (60, 120, 180 y 300 s). Las muestras tratadas se colocaron durante 10 s en caldo neutralizante (Dey-Engley, Fluka, España) y se dejaron secar a temperatura ambiente. El recuento microbiano de los sobrevivientes se realizó como se describió en el apartado 5.5.1.4

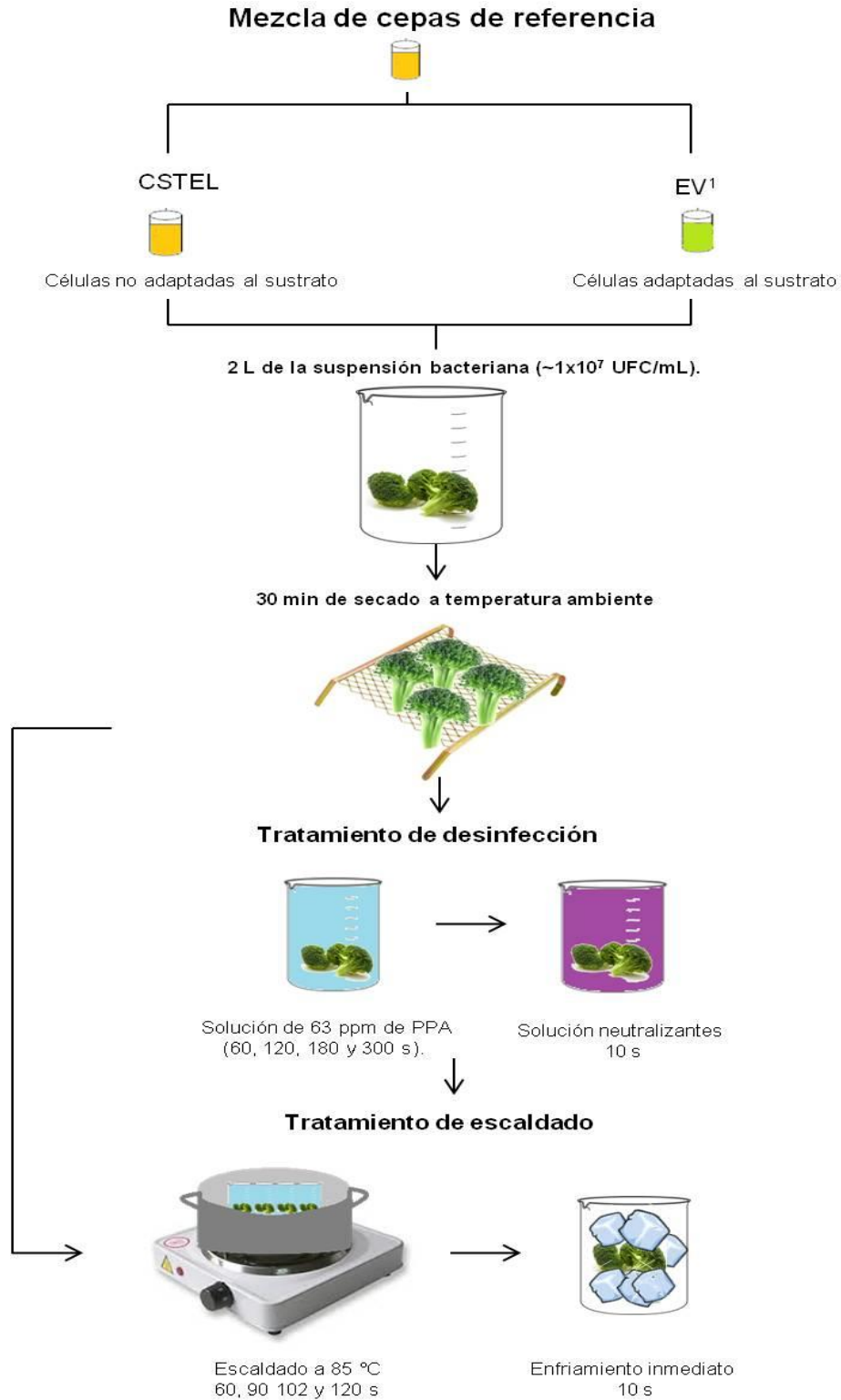


Figura 6. Diagrama de flujo del efecto de la adaptación al sustrato de *L. monocytogenes* inoculada en brócoli ante tratamiento de desinfección y escaldado solos y combinados.

5.5.2.3 Escaldado de hortalizas frescas inoculadas con *L. monocytogenes*

Las muestras inoculadas se escaldaron mediante inmersión en agua caliente. El brócoli fue escaldado a 85°C, mientras que la coliflor y la zanahoria anaranjada a 90°C. El escaldado fue realizado a diversos tiempos; para el caso del brócoli a 60, 90, 102 y 120s; para la zanahoria a 30, 60, 90 y 120 s; y para la coliflor a 20, 40, 80 100 s. Trascurrido el tiempo de inmersión las muestras se enfriaron en un baño de agua fría con hielo, y se dejaron secar a temperatura ambiente. El recuento microbiano se realizó de la misma manera que en el apartado 5.5.1.4

5.5.2.4 Efecto de los procesos continuos de desinfección y escaldado sobre la viabilidad de *L. monocytogenes* inoculada en hortalizas frescas

Las hortalizas (brócoli, zanahoria y coliflor) inoculadas con *L. monocytogenes* se desinfectaron por inmersión en una solución con 63 ppm de ácido peracético¹ durante 60 s y posteriormente se sometieron al tratamiento de escaldado siguiendo la misma metodología del apartado 5.5.2.3. durante 102, 90 y 80 s para brócoli, zanahoria y coliflor, respectivamente.

5.5.3 Análisis estadístico

La concentración de los sobrevivientes fueron transformados a Log UFC/g y se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se usaron las pruebas t de Student y Tukey para realizar la comparación de medias. Se empleó programa JMP 8.0

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Incidencia y distribución de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*

Durante un año se analizaron 574 muestras de producto, superficies de contacto directo y de no contacto con el alimento a lo largo del proceso de producción de una planta procesadora de hortalizas congeladas. De manera general, la incidencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* fue de 10.04 y 6.69, 9.29 y 5.58 y 28.78 y 27.27 % en producto (n= 239), superficie de contacto (n= 269) y superficie de no contacto (n= 66), respectivamente (Cuadro 5). En la zona de corte las muestras positivas a este patógeno se encontraron en la materia prima, lo que era de esperarse debido a la ubicuidad de este patógeno. En el caso de la zona de lavado y desinfección, *L. monocytogenes* estuvo presente en los patines de los montacargas, situación preocupante porque a pesar de que esta superficie no esta en contacto con el producto dicho equipo recorre diversas partes de la planta pudiendo ser un medio apropiado para diseminar la contaminación dentro de la misma. También resultó positiva una muestra del agua de recirculación donde el producto es lavado, la cual se incluyó en las superficies de no contacto. La presencia de este patógeno en el agua de recirculación puede ser un factor detonante ya que pudiera contaminar más producto; también podría indicar una contaminación reciente al estar viable el patógeno en el agua.

En al área de escaldado y congelación, las coladeras fueron las únicas muestras que resultaron positivas y aunque no existe ningún contacto de las mismas con el producto si los procesos de lavado y desinfección no se realizan adecuadamente se puede llegar a generar contaminación cruzada a la hora del lavado de pisos y equipo. En las áreas de empaclado del producto final es en donde se observó la mayor incidencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*, situación preocupante, ya que después de esta etapa no se aplica ningún tratamiento que ayude a eliminar o reducir la concentración *L. monocytogenes*. Se observó que algunos de los equipos que se encuentran en esta zona son de difícil acceso para

llevar a cabo una correcta limpieza y desinfección, y eventualmente pueden ser nichos potenciales para que *L. monocytogenes* se adhiera y forme biopelículas dificultando aun más el lavado y desinfección eficiente de los equipos.

Cuadro 5. Incidencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* durante el procesamiento de frutas y hortalizas congeladas

Zona	Tipo de muestra	No. de muestras	<i>Listeria</i> spp. ¹	<i>L. monocytogenes</i> ²
Corte	Superficie de contacto	35	0 (0)	0 (0)
	Producto	40	4 (10)	4 (10) ³
Lavado y desinfección	Superficie de contacto	14	1 (7.14)	1 (7.14)
	Producto	15	0 (0)	0 (0)
	Superficie de no contacto	5	3 (60)	2 (40)
Escaldado y congelación	Superficie de contacto	21	0 (0)	0 (0)
	Producto	20	0 (0)	0 (0)
	Superficie de no contacto	5	2 (40)	2 (40)
Empacado Línea 1	Superficie de contacto	105	10 (9.5)	8(7.6)
	Producto	80	16 (20)	10 (8) ³
	Superficie de no contacto	20	7 (35)	7 (35) ³
Empacado Línea 3	Superficie de contacto	94	14 (14.9)	6 (6.4) ³
	Producto	84	4 (4.8)	2 (2.4) ³
	Superficie de no contacto	36	7 (19.4)	7 (19.4)

^a En el Anexo 7 se desglosa la información sobre la detección de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*

¹ Confirmación mediante pruebas bioquímicas

² Confirmación por PCR

³ Muestra en donde se encontró la presencia de *L. monocytogenes* y otras especies

En las Figuras 7 y 8 se observan los diagramas de las líneas de empaqueo (1 y 3) en los cuales se encuentran señalados los puntos en donde se detectó *L. monocytogenes*. En la línea 1 la incidencia global de *L. monocytogenes* fue 12.2%, mientras que en la línea 2 la incidencia fue menor (7.00 %). La diferencia en la positividad entre estas dos líneas puede atribuirse a que el equipo de la línea de empaque 1 es más pequeño y más accesible para el muestreo que el equipo de la línea de empaque 3. De igual forma es posible que en la línea de empaque 1 se haya generado alguna falla en las BMP que influyeran en la incidencia de dicho patógeno, ya que a pesar de que en ambas líneas se encontraron muestras positivas en producto en proceso, en la línea de empaque 1 se encontró una elevada incidencia en el producto final, lo cual no fue observado en la línea de empaque 3. Las superficies de contacto directo que en ambas líneas se encontraron contaminadas con el patógeno fueron el toten, el inicio del elevador, el final del elevador y el cono. En la línea 3 también se encontraron muestra positivas en la superficie del dosificador. Como se mencionó, *L. monocytogenes* en estos equipos puede llegar a prevalecer debido a la baja accesibilidad para llevar a cabo una correcta limpieza y desinfección. Adicionalmente, si los tratamientos se aplican con poca frecuencia el problema se puede agravar, ya que se propicia la acumulación de materia orgánica y eventualmente la formación de biopelículas microbianas.

Por otra parte la incidencia en las superficies de no contacto fue similar y elevada en ambas líneas de empaque. Aguado *et al.* (2001) reportaron que la contaminación de superficies de no contacto pueden llegar a ser las responsables de la contaminación de los productos. En el estudio realizado en este proyecto as muestras positivas de superficies de no contacto que resultaron positivas fueron: coladeras, pisos, zapatos, patines de montacargas, así como la pala de recolección de residuos. Lo anterior pone de manifiesto que puede existir la posibilidad de una contaminación cruzada a partir de estas fuentes de contaminación (superficies de no contacto).

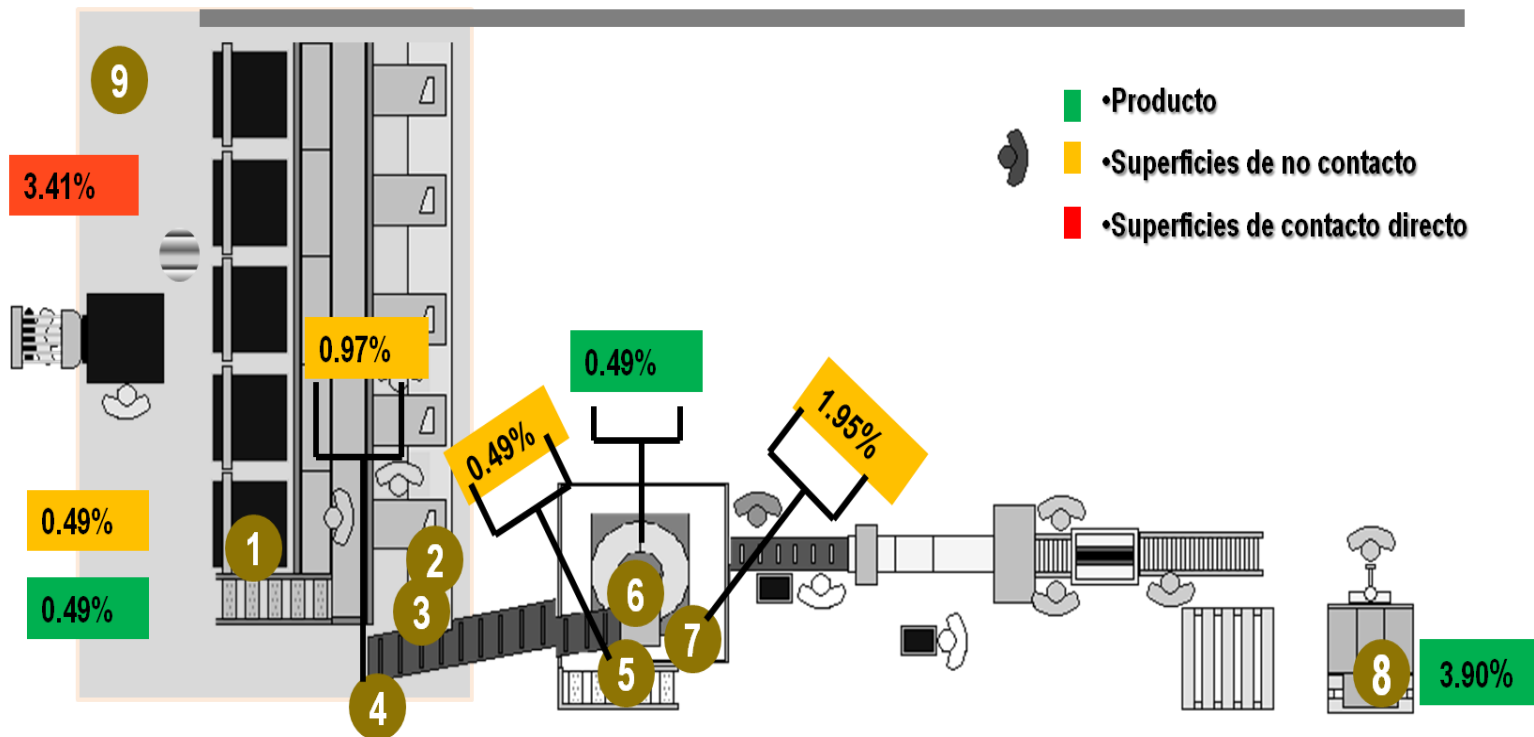


Figura 7. Incidencia de *L. monocytogenes* en la línea de empaqueo 1. Recuadros verdes: incidencia en producto; recuadros amarillos: incidencia en superficie de contacto directo; recuadros rojos: incidencia en superficie de no contacto. 1) Toten, 2) Vibrador, 3) Barra entre el vibrador y el elevador, 4) Inicio del elevador, 5) Final del elevador, 6) Dosificador, 7) Cono, 8) Producto terminado, 9) Coladera, piso, pared, etc.

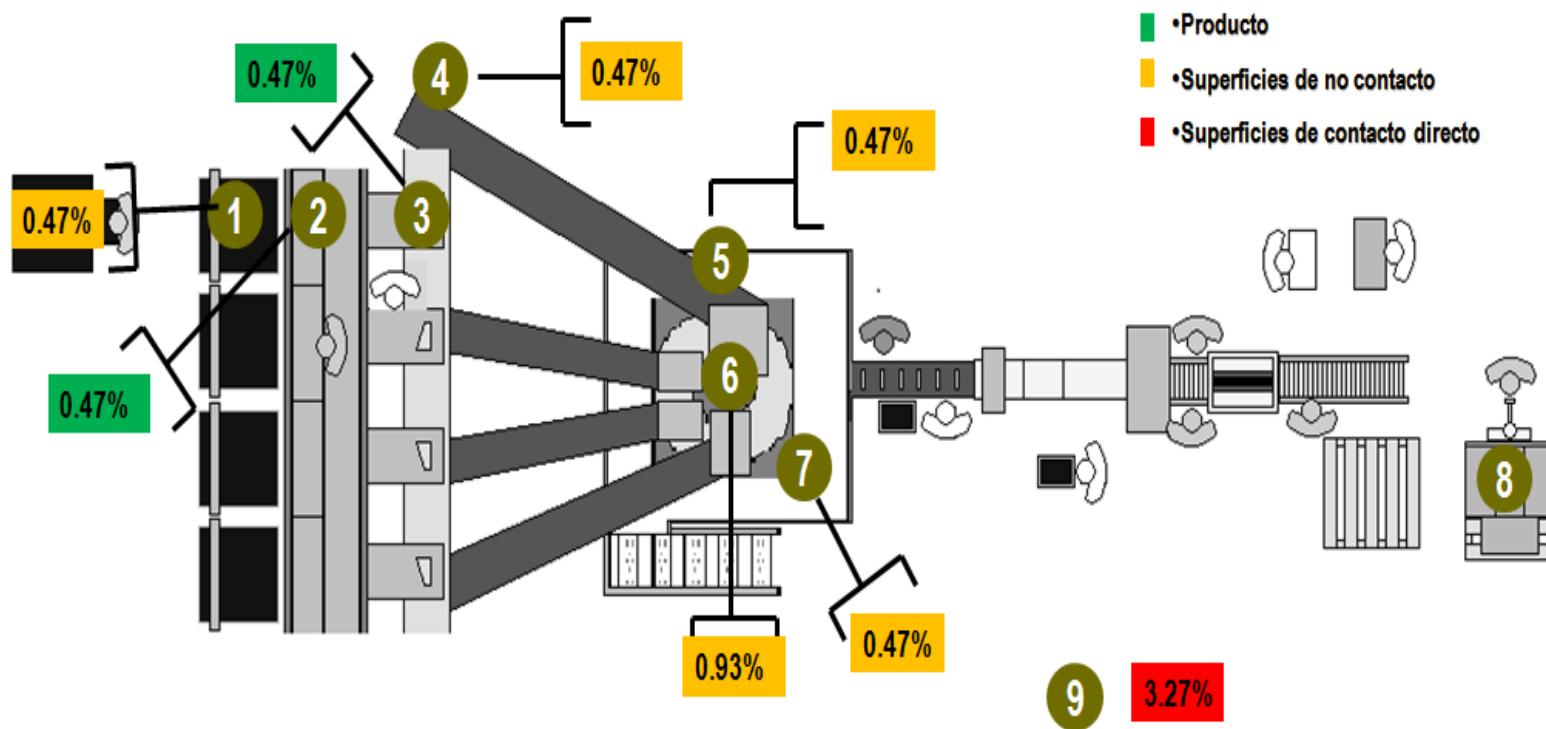


Figura 8: Incidencia de *L. monocytogenes* en la línea de empaclado 3. Recuadros verdes: Incidencia en producto; recuadros amarillos: incidencia en superficie de contacto directo; recuadros rojos: incidencia en superficie de no contacto. 1) Toten, 2) Caída del toten antes del vibrador, 3) Vibrador, 4) Inicio del elevador, 5) Final del elevador, 6) Dosificador, 7) Cono, 8) Producto terminado, 9) Coladera, piso, pared, etc.

Otro aspecto importante de destacar es que en las zonas de lavado y desinfección y escaldado y congelación no se detectaron muestras de producto positivas a *L. monocytogenes*, lo que refuerza la idea de que la re-contaminación ocurre en la zona de empaçado.

La incidencia de *L. monocytogenes* dentro de la empresa bajo análisis fue mayor a la reportada por Aguado *et al.* (2004) en donde se observó una incidencia del 1.2% en hortalizas congeladas y en superficies de contacto. Por otro lado Pappelbaum *et al.* (2008) reportaron una incidencia superior (46% en hortalizas congeladas y 41.3% en superficies) en este tipo de industria. Estos hallazgos sugieren que la incidencia de *L. monocytogenes* varía de acuerdo a la planta procesadora en cuestión.

Los resultados de este estudio permitieron conocer los puntos potenciales en donde ocurre la contaminación del alimento, lo cual ayudará a desarrollar medidas de control efectivas, para evitar la contaminación del producto y eliminar aquellos nichos que se hayan formado en algunas superficies. Algunas de las medidas recomendadas para la empresa incluyeron:

- Reforzar la capacitación dada a los empleados sobre las BPM.
- Realizar periódicamente procedimientos de lavado y desinfección exhaustivos en las líneas de empaque para tratar de eliminar las posibles biopelículas formadas, pudiéndose emplear agentes tensoactivos aniónicos como alquilbenceno lineal sulfonato, así como limpieza mecánica vigorosa.
- Desarmar con mayor frecuencia los equipos como el cono para llevar a cabo una limpieza exhaustiva.
- Evaluar la efectividad de los agentes detergentes y desinfectantes que se emplean en el proceso de lavado y desinfección de equipos.
- Limpiar y desinfectar frecuentemente los patines de los montacargas ya que son un vehículo importante de diseminación de la contaminación.

- Eliminar los residuos de alimentos que queden en los diversos equipos de manera frecuente para evitar que se genere un nicho ecológico para *L. monocytogenes*.
- Eliminar frecuentemente la presencia de residuos de alimentos en los pisos, así como mantener alejadas las palas de recolección de la zona de producción.
- Desinfectar las zonas donde se hayan eliminado los residuos.
- Reemplazar periódicamente la solución desinfectante de los tapetes sanitarios.
- Evitar la acumulación de agua en los pisos.

6.2 Trazabilidad de la contaminación de *L. monocytogenes* dentro de la planta procesadora de hortalizas congeladas mediante la tipificación molecular por la técnica de campos eléctricos pulsados

A lo largo de los muestreos realizados dentro de la planta procesadora de hortalizas congeladas se aislaron 74 cepas de *L. monocytogenes*, de las cuales 61 fueron caracterizadas molecularmente por la técnica de campos eléctricos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) empleando la enzima de macrorestricción Apal. Las cepas analizadas fueron recuperadas tanto de producto, superficies de contacto directo y superficies de no contacto con el producto. Usando esta técnica de tipificación se encontraron 11 pulsotipos diferentes (A-K) (Figura 9).

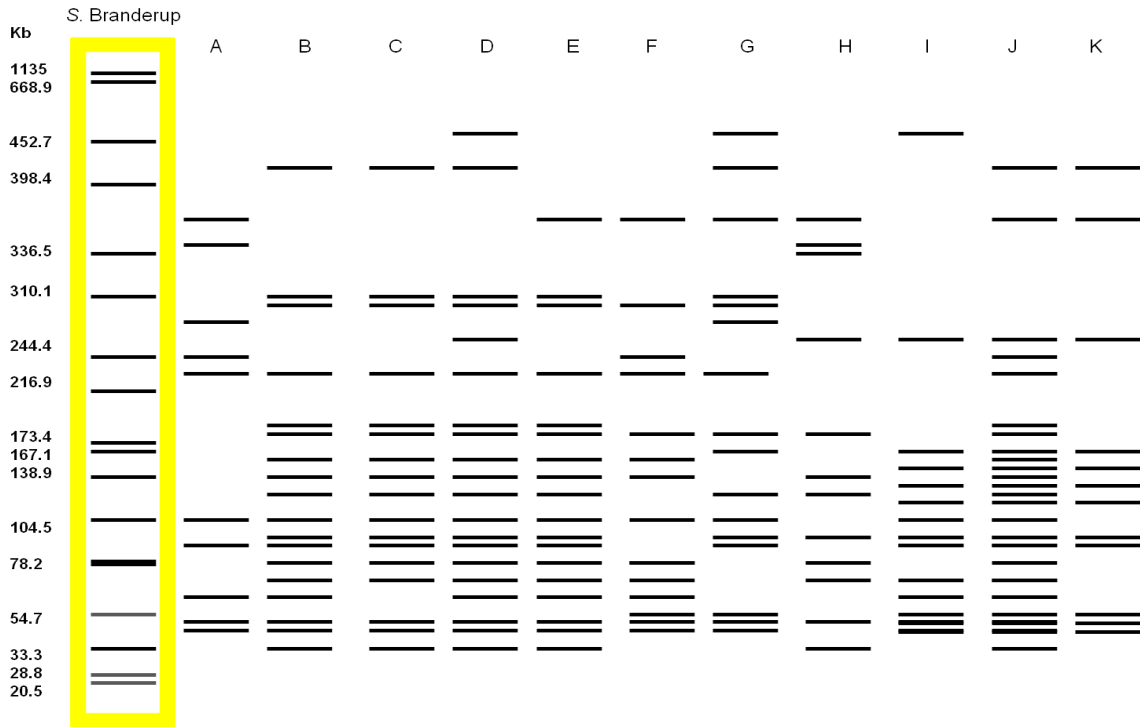


Figura 9. Pulsotipos de *L. monocytogenes* encontrados dentro de la empresa procesadora de hortalizas congeladas.

En la Figura 10 se observa el dendograma de todas las muestras tipificadas agrupadas en los diferentes pulsotipos. El pulstipo B fue el más frecuente ya que se encontró en el 63.93% de las cepas aisladas, mientras que el pulstipo F se encontró en el 6.55%, el D en el 4.92%, los pulsotipos E, H, J y K en el 3.28% y los pulsotipos A, C y G únicamente en el 1.63% de las cepas aisladas. En el caso de las cepas tipificadas como pulstipo B, estas se aislaron de los tres tipos de muestra, mientras que pulsotipos como A, F, G, H, I y J solo se encontraron en producto. De acuerdo al análisis de similitud genética obtenido con el dendograma se observó que el pulstipo B y los mencionados anteriormente no tienen una relación genética clara, mientras que los pulsotipos C, D y E si la tienen, encontrándose agrupados en el mismo y único grupo teniendo un porcentaje de similitud mayor al 80% (Cardozo-Bernal *et al.*, 2013).

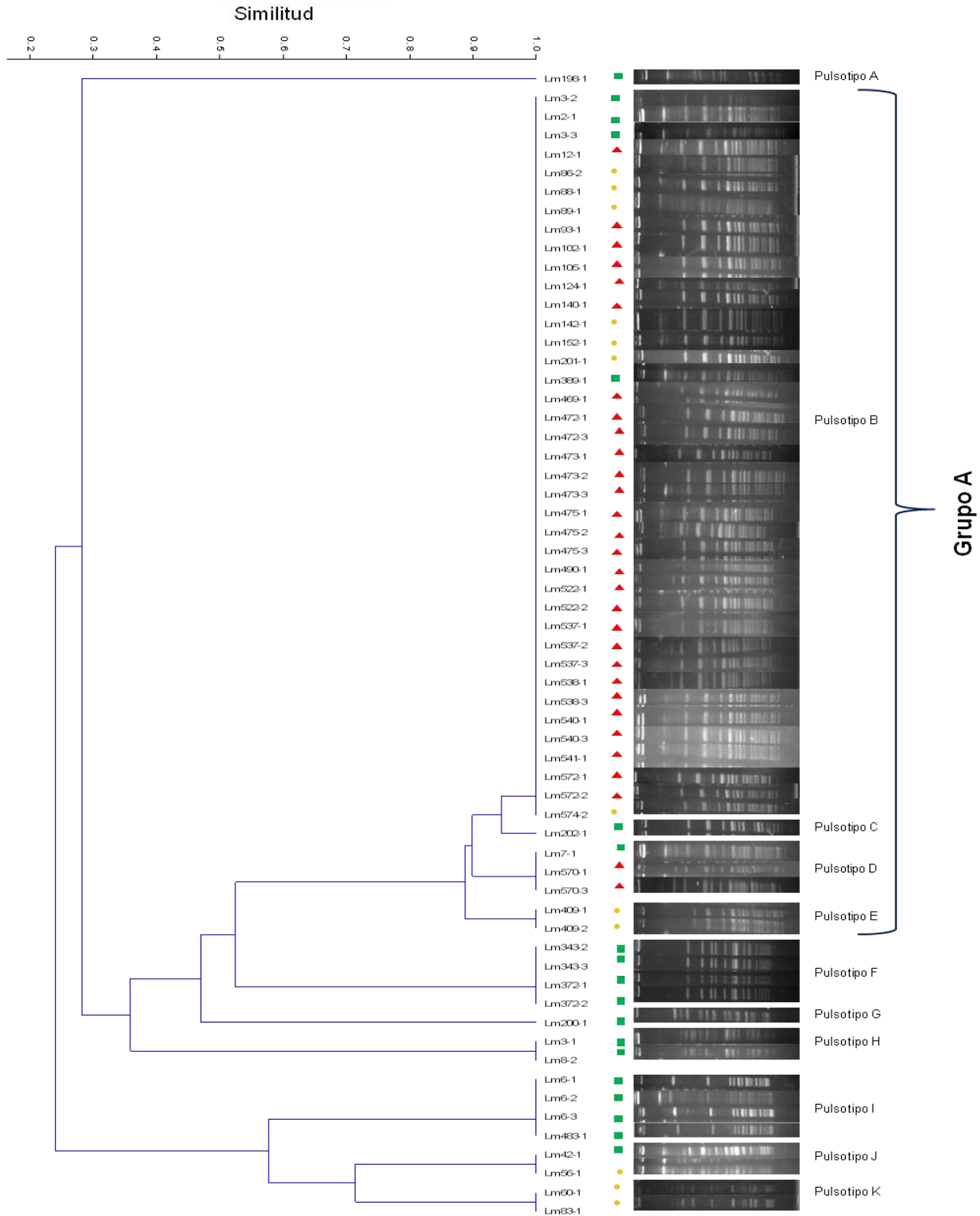


Figura 10. Dendrograma de los pulsotipos obtenidos de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la planta procesadora de hortalizas congeladas empleando la enzima *Apa1*. Cuadro verde (producto), círculo amarillo (superficie de contacto con el producto) y triángulo rojo (superficie de no contacto)

En el Cuadro 6 se observa la presencia de los pulsotipos durante los muestreos que se realizaron; el pulsotipo B es el único que prevalece durante todo el periodo de muestreo. Ferreira *et al.* (2014) menciona que en diversos estudios se ha definido a las cepas como persistentes cuando estas son encontradas en al menos dos o tres muestreos realizados en diferentes tiempos en un mismo sitio. En ese sentido, se podría considerar que las cepas de *L. monocytogenes* que presentan el pulsotipo B son persistentes dentro de la planta procesadora ya que no solo fueron recuperadas en los diversos muestreos sino también en diversas zonas de procesamiento a lo largo de la cadena productiva y en los tres diferentes tipos de muestras.

El hecho de que este pulsotipo persista en este ambiente sugiere que existen cepas que tienen la capacidad de adaptarse mejor que otras a los diversos tipos de estrés a los que pueden enfrentarse dentro de la empresa

Por otro lado, la presencia esporádica de otros pulsotipos que no mostraron relación con el pulsotipo B es evidencia de que esporádicamente ocurren otras vías de contaminación.

Cuadro 6. Pulsotipos de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la planta procesadora de hortalizas congeladas durante siete muestreos

Muestreo realizadas	Pulsotipo
Muestreo 1	B (4) ¹ , D (1), H (2), I (3)
Muestreo 2	B (7), J (2), K (2)
Muestreo 3	B (3)
Muestreo 4	B (1), F (4)
Muestreo 5	B (9), E (2)
Muestreo 6	B (13), D (2)
Muestras recibidas	A (1), B (2), C (1),G (1), I (1)

¹Número de cepas que presentan el pulsotipo señalado

En la Figura 11 se presenta la distribución de los pulsotipos encontrados a lo largo del proceso de producción de hortalizas congeladas. En el área de corte se detectaron 4 pulsotipos diferentes (B, C, F y I) en la materia prima. En el área de lavado y desinfección, así como en la de escaldado y congelación el pulsotipo B fue el único que se encontró en todas las muestras positivas a *L. monocytogenes*, que resultaron ser superficies de no contacto. En el área de lavado y desinfección las muestras fueron los patines del montacargas y en el área de escaldado y congelación las coladeras.

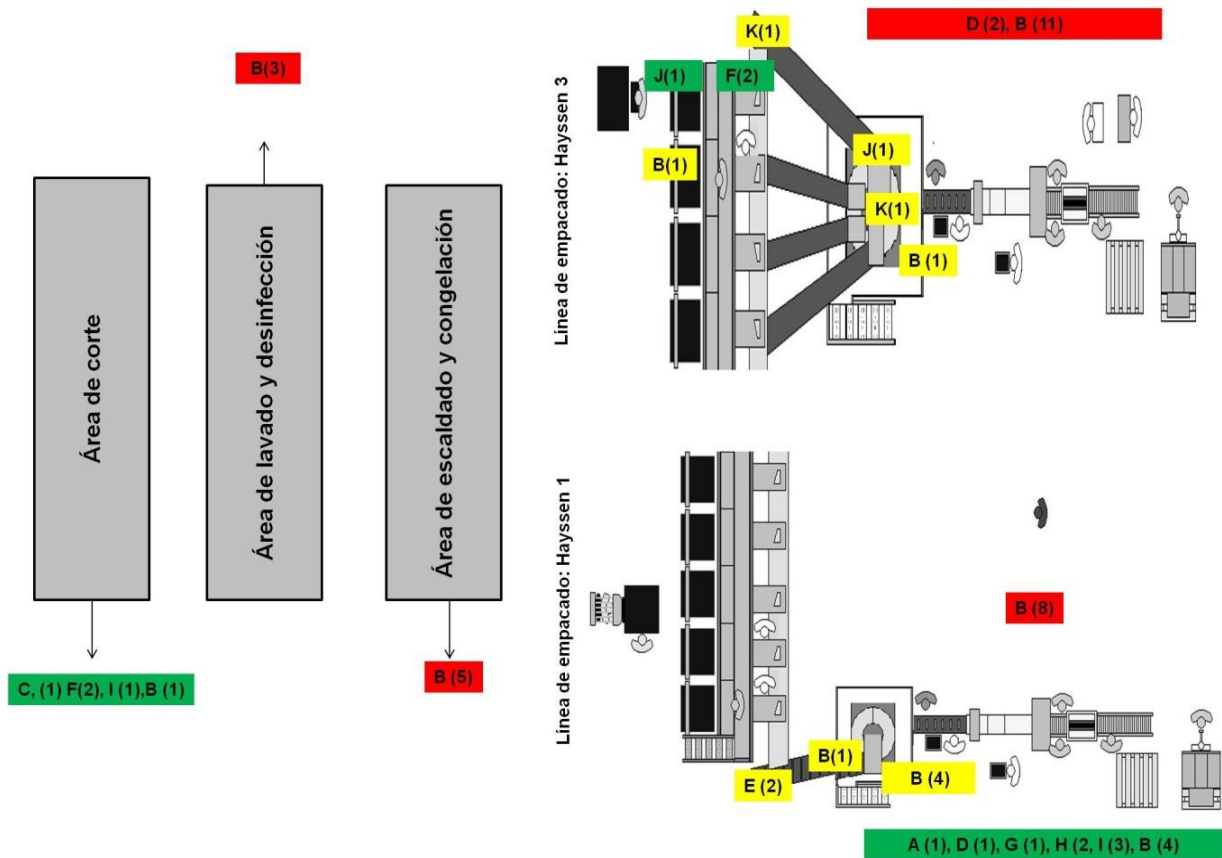


Figura 11. Distribución de los pulsotipos de *L. monocytogenes* dentro de las áreas de procesamiento de hortalizas congeladas. En los recuadros se encuentran marcados los pulsotipos encontrados en cada área. Recuadro verde representa que dicho pulsotipo fue hallado en el producto; recuadro amarillo pulsotipos encontrados en superficie de contacto directo; recuadros rojos pulsotipos encontrados en superficies de no contacto.

En la línea de empaqueo 1, los pulsotipos A, B, D, G, H e I fueron encontrados en el producto final. El pulsotipo B se encontró tanto en el producto final como en superficies de contacto directo (final del elevador y cono) y en las superficies de no contacto (coladera, piso y suela de los zapatos de los trabajadores).

En la línea de empaqueo 3, se observó un comportamiento similar a la línea de empaqueo 1. Nuevamente el pulsotipo B se encontró tanto en las superficies de no contacto (piso, coladera) como en superficies de contacto directo (toten, cono). Por otra parte los pulsotipos J y K también fueron detectados dentro de la línea de empaque; el primero se encontró en producto al inicio del proceso de empaqueo y en una superficie de contacto (final del elevador), mientras que el pulsotipo K se encontró tanto en el inicio del elevador como en el dosificador. Ambos pulsotipos solo se detectaron durante el segundo muestreo lo cual puede sugerir una contaminación esporádica.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos en el estudio de Pappelbaum *et al.* (2008). Ellos señalaron que el hecho de encontrar el mismo pulsotipo en muestras antes y después del escaldado, se debe a una recontaminación masiva. También observaron que existía una contaminación cruzada entre una superficie de no contacto (piso), con una superficie de contacto directo (guantes) al encontrar cepas indistinguibles por la técnica de PFGE.

6.3 Relación de *L. monocytogenes* con *Listeria* spp. y microorganismos indicadores

6.3.1 Relación entre la presencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*

En la industria alimentaria la detección de *L. monocytogenes* suele ser incompleta, ya que los análisis concluyen con el aislamiento en medios selectivos como Oxford Agar, MOX y PALCAM. Sin embargo estos medios nos indican solo la posible presencia del género *Listeria* (Pouch e Ito 2001), ya que no son específicos para la especie patógena al hombre. En nuestra experiencia hemos visto que en pocas empresas se realiza la confirmación de las colonias presuntivas, ya sea por métodos bioquímicos, enzimáticos o moleculares, probablemente debido al costo,

al tiempo que requiere y a la ausencia de personal capacitado para llevar a cabo las pruebas. Por lo cual es importante evaluar la asociación que existe entre el género *Listeria* y específicamente la especie *monocytogenes* para determinar si el primero puede ser usado para predecir la presencia de *L. monocytogenes*.

El análisis de contingencias para establecer la posible relación entre la presencia de *Listeria* spp. con *L. monocytogenes* en productos, superficies de contacto y superficies de no contacto mostró una correlación positiva ($P < 0.0001$) con la prueba de Pearson. La relación entre el género y la especie fue del 66.7, 60.0 y 94.7 % en el producto, superficie de contacto directo y superficie de no contacto, respectivamente (Cuadros 7, 8 y 9). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Lianou y Sofos (2007) señalan que la presencia de cualquier especie de *Listeria* en productos listos para el consumo sugiere una carencia de higiene y la presencia potencial de la especie *monocytogenes*. Sin embargo, otros estudios como el de Hoffman *et al.* (2002) concluyen que la presencia de *Listeria* spp. en muestras ambientales colectadas durante el procesamiento de pescado, no es un indicador confiable y constante de *L. monocytogenes*. Alali y Schaffner (2013) por otra parte evaluaron la relación de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en plantas procesadoras de alimentos marinos, y encontraron que *Listeria* spp. no es un buen indicador de *L. monocytogenes* en superficies de contacto directo con el producto, pero sí en superficies de no contacto.

Dado lo anterior podemos sugerir que la relación entre *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* depende del tipo de empresa así como del tipo de muestra. En el caso particular de la empresa de hortalizas congeladas la presencia de *Listeria* spp. en cualquier tipo de muestra puede emplearse como indicador de la presencia de *L. monocytogenes*, ayudando a la toma de decisiones de manera inmediata. Sin embargo, es importante mencionar que esto no sustituye la necesidad de confirmar la presencia del patógeno en el producto terminado.

Cuadro 7. Tabla de contingencia de la relación entre *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en hortalizas congeladas

<i>L. monocytogenes</i>			
<i>Listeria</i> spp.	No. de muestras Porcentaje (%)	Ausencia	Presencia
	Ausencia	215 100	0 0.00
	Presencia	8 33.3	16 66.7

Cuadro 8. Tabla de contingencia de la relación entre *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en superficie de contacto directo con el producto.

<i>L. monocytogenes</i>			
<i>Listeria</i> spp.	No. de muestras Porcentaje (%)	Ausencia	Presencia
	Ausencia	244 100	0 0
	Presencia	10 40.0	15 60.0

Cuadro 9. Tabla de contingencia de la relación entre *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en superficies de no contacto.

<i>L. monocytogenes</i>			
<i>Listeria</i> spp.	No. de muestras Porcentaje (%)	Ausencia	Presencia
	Ausencia	47 100	0 0.00
	Presencia	1 5.3	18 94.7

6.3.2 Contenido de microorganismos indicadores y su relación con la presencia de *L. monocytogenes*

La supervisión microbiológica de las superficies de contacto directo con los productos alimentarios, son una herramienta importante para detectar posibles fallas en las BMP y para identificar nichos de bacterias patógenas. Al saber cuáles son los nichos potenciales de contaminación se pueden tomar medidas correctivas,

con la finalidad de evitar que el producto final se contaminé con bacterias patógenas. La situación ideal sería la detección del patógeno de interés en los alimentos y en las superficies. Sin embargo, la detección y cuantificación de bacterias patógenas tiene ciertas limitantes entre las que destacan, la baja concentración del microorganismo patógeno, el alto costo y tiempo que conlleva realizar los análisis para su detección. Por lo cual se pueden utilizar los microorganismos indicadores/índices.

En este estudio se evaluó la relación entre el contenido de grupos indicadores bacterianos BMA, CT y BAL y la presencia de *L. monocytogenes* en superficies de contacto directo con la finalidad de ver si alguno de estos grupos pudiera ser empleado como microorganismos índice potenciales para el patógeno. De manera general, la mediana de los recuentos microbianos de BMA, CT y BAL fue de 4.11, 2.49 y 2.92 Log UFC/100 cm², respectivamente. El mayor contenido de todos los grupos indicadores ocurrió en las superficies de contacto que se encontraban al inicio del proceso (zona de corte), lo que era de esperarse ya que estas tuvieron contacto con la materia prima recién ingresada (Figura 12). Sin embargo, también se detectaron altos contenidos en algunas superficies dentro de las líneas de empaque como la superficie del cono en la línea de empackado 3 (Hayssen 3). El hecho puede ser atribuido a que esta superficie no siempre se desarma durante los lavados para ser limpiada correctamente, y como se mencionó anteriormente en esta superficie fue detectado el pulsotipo B de *L. monocytogenes*, que es el que prevalece en la empresa. El hallazgo de elevados contenidos de los grupos indicadores y de la presencia del patógeno de interés, enfatiza la necesidad de revisar y mejorar los procedimientos de limpieza y desinfección en ambas líneas de empaque. Es indispensable eliminar toda la materia orgánica para evitar la formación de nichos bacterianos.

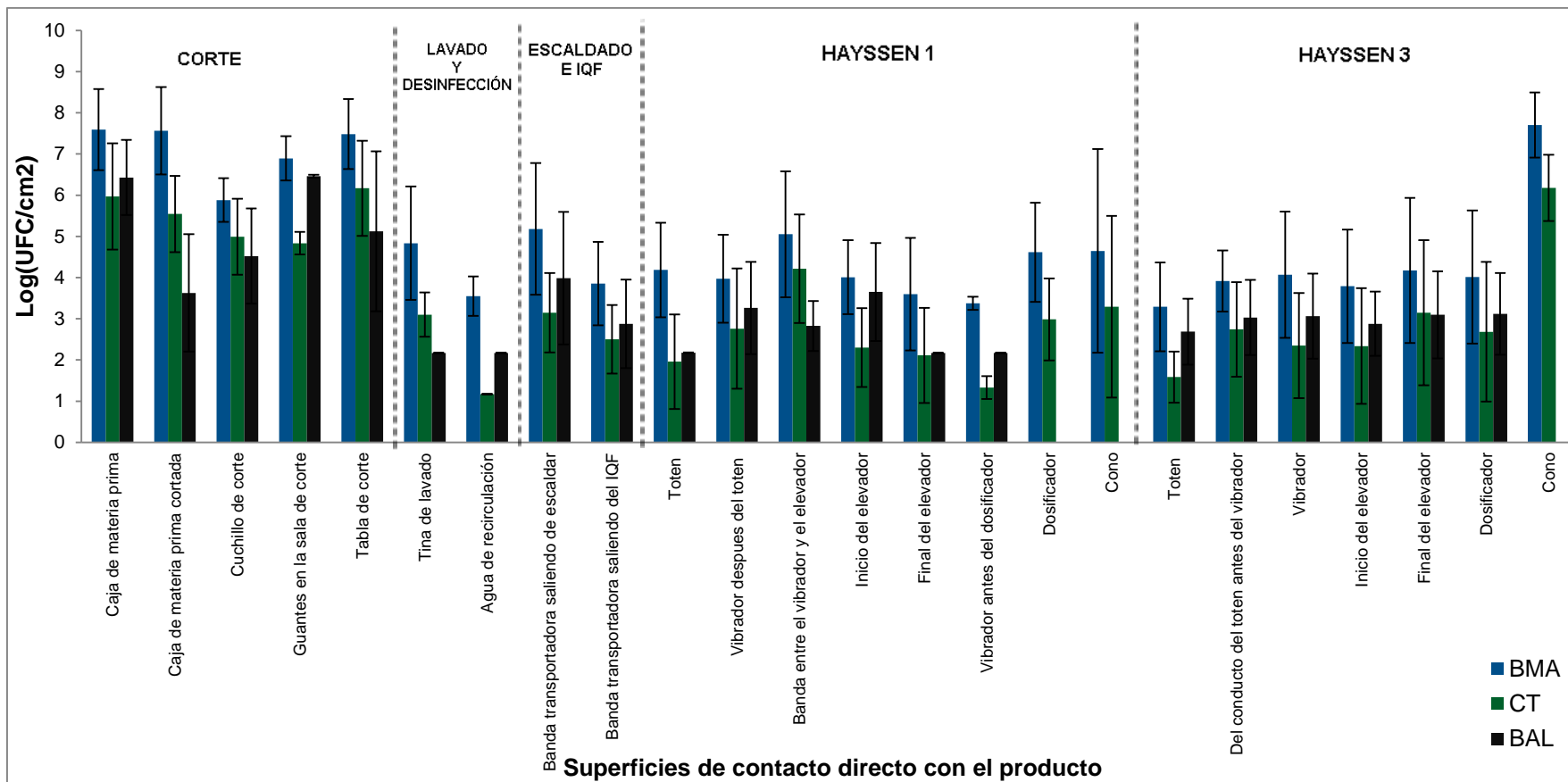


Figura 12. Contenido de bacterias indicadoras en superficies de contacto directo dentro de la planta procesadora de hortalizas congeladas. Límite de detección para BMA y CT 1.17 Log UFC/100 cm² y para BAL 2.17 Log UFC/ 100 cm²

En la Figura 13 se muestran los histogramas de frecuencia de la concentración de los microorganismos indicadores y la presencia/ausencia de *L. monocytogenes*. Se observa que en presencia de *L. monocytogenes* la media de la concentración de BMA y CT es mayor que en su ausencia. En el caso de las BMA la concentración promedio en ausencia del patógeno fue de 4.45 Log UFC/100 cm², mientras que en presencia del mismo fue de 5.99 Log UFC/100 cm². La concentración promedio de CT en superficies de contacto fue de 2.89 y 4.21 Log UFC/cm² en ausencia y presencia del patógeno, respectivamente. Las BAL no mostraron la misma tendencia; obteniendo en ausencia y presencia del patógeno una media en la concentración de 3.39 Log UFC/cm² y 3.50 Log UFC/cm², respectivamente.

Mediante una regresión logística se evaluó el efecto que tiene la concentración de estas bacterias indicadoras en presencia de *L. monocytogenes*. Se observó que la concentración de BMA y CT tiene un efecto significativo sobre la presencia del patógeno en superficies de contacto (Cuadro 10). Sin embargo, en el caso de los CT, el porcentaje de frecuencia más elevado ocurrió alrededor de los 2 LogUFC/cm² en presencia o en ausencia de patógeno, lo que podría ser una limitante para su uso potencial como microorganismo índice de *L. monocytogenes*.

Por lo tanto las BMA podrían ser usadas como microorganismo índice de *L. monocytogenes* ya que cumplen con algunas características deseables como bajo costo, fácil y práctica detección. Sin embargo, es recomendable realizar estudios sobre el hábitat de estos microorganismos y su relación con *L. monocytogenes*, así como evaluar y comparar su capacidad de sobrevivencia y proliferación en diversos sustratos y puntos durante el procesamiento de hortalizas congeladas.

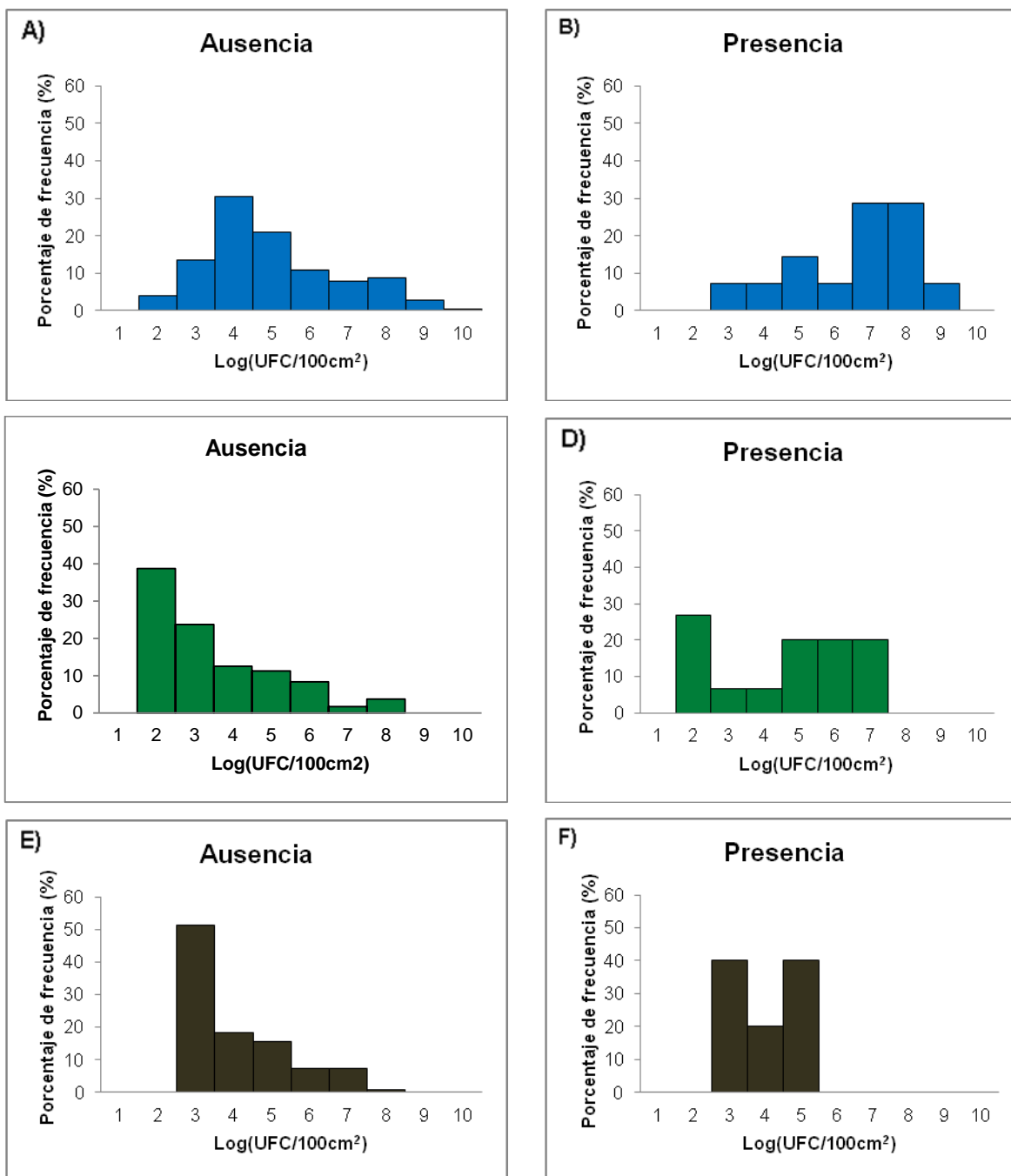


Figura 13. Histogramas de la relación entre la concentración de bacterias indicadoras en presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en superficies de contacto directo con el producto en una empresa de vegetales congelados.

A) y B) Concentración de bacterias mesófilas aerobias en ausencia y presencia de *L. monocytogenes*. C) y D) Concentración de coliformes totales en ausencia y presencia de *L. monocytogenes*. E) y F) Concentración de bacterias ácido lácticas en ausencia y presencia de *L. monocytogenes*.

Cuadro 10. Efecto de la concentración de bacterias indicadoras sobre la presencia de *L. monocytogenes* en superficies de contacto con el alimento

Indicador	Prob>Chisq
Bacterias mesófilas aerobias (BMA)	0.0012*
Coliformes totales (CT)	0.0050*
Bacterias ácido lácticas (BAL)	0.8698

Las BMA y CT son utilizados ampliamente como microorganismos indicadores de malas prácticas de higiene, por lo cual tiene sentido lo mencionado anteriormente donde se sigue que la contaminación en la empresa puede deberse al uso inadecuado de las BPH.

6.4 Adaptación al sustrato de células de *L. monocytogenes* y su efecto sobre el desarrollo en EV

Los patógenos que se encuentran presentes en el ambiente del procesamiento de alimentos están expuestos a diversos tipos de estrés como son la exposición a bajas cantidades de nutrientes, a agentes desinfectantes y a cambios drásticos de temperatura. Se ha observado que la exposición de células de *L. monocytogenes* a ciertos tipos de estrés puede llegar a generar una adaptación a los mismos o a otros tipos (adaptación cruzada) (Lou y Yousef, 1996; Lundén *et al.*, 2003). La adaptación de *L. monocytogenes* a sustratos que se encuentran en la industria de hortalizas pudiera influir en la capacidad desarrollo del microorganismo en restos del alimento y la formación de biopelículas, hechos que pudieran relacionarse con la posible prevalencia de este patógeno en la planta procesadora.

Las 74 cepas aisladas de la industria de hortalizas congeladas fueron expuestas a ácido peracético (30 ppm) y se seleccionaron las cinco más tolerantes y las cinco más susceptibles (Cuadro 11). En este cuadro podemos observar que las cepas tolerantes tuvieron reducciones que oscilan entre los 2 LogUFC/mL y

estas fueron aisladas principalmente de superficies de no contacto como es el caso de pisos, patines de monta carga y coladeras. La tolerancia de estas cepas puede atribuirse a que en dichas superficies es donde se descarga tanto las aguas de lavada como de desinfección, y son empleadas mayores concentraciones de agentes desinfectantes que en otras superficies. Mientras que las cepas susceptibles tuvieron reducciones mayores a los 5 LogUFC/mL y la mayoría pertenecía a producto y superficies de contacto directo, como el caso del cono. El cono forma parte de la línea de empaclado y no es desmontado para el lavado de manera frecuente.

Cuadro 11. Cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la empresa resistentes y susceptibles a ácido peracético

Tipo de cepa	Cepa	Origen	Zona de aislamiento
Tolerantes Reducción: 1.79-2.29 LogUFC/mL	124-1	Patines de monta carga	Lavado y desinfección
	389-2	Coladera	Hayssen 3
	409-1	Inicio del elevador	Hayssen 1
	469-1	Coladera	Hayssen 1
	572-2	Piso	Hayssen 3
Susceptibles Reducción: 5.11-5.63 Log UFC/mL	7-1	Champiñón (PT)	Hayssen 1
	140-1	Cono	Hayssen 1
	142-1	Cono	Hayssen 1
	181-1	Chícharo	Hayssen 1
	475-2	Pala para recoger producto	Hayssen 3

Se evaluó si existía alguna relación entre el pulsotipo y la tolerancia a ácido peracético, la cual no se observó. La mayoría de las cepas seleccionadas, tanto las

susceptibles como las tolerantes a este desinfectante, pertenecían al pulsotipo B. A pesar de que la mayoría de las cepas susceptibles y tolerantes al ácido peracético tienen el mismo perfil genético, presentan características fenotípicas diferentes, posiblemente asociadas a la capacidad para adaptarse a las diversas condiciones de estrés a las que se exponen dentro de la planta procesadora, que no necesariamente está ligada a un cambio en perfil genético. Por lo cual es importante no solo evaluar los perfiles genéticos de los patógenos persistentes sino también realizar perfiles fenotípicos que nos permitan entender su comportamiento dentro de diversos ambientes. Por lo que habiendo seleccionado las cepas de *L. monocytogenes* tolerantes y susceptibles a ácido peracético, se evaluó su capacidad de desarrollo en EV sólo y adicionado con ácido peracético (15 y 30 ppm), cuando estas habían crecido previamente en un medio óptimo (CST) y en un medio con nutrientes (EV) obtenido de las hortalizas. Los datos de densidad óptica obtenidos con el Bioscreen se modelaron con el programa DMFit. En la Figura 14 se muestran las graficas modeladas del desarrollo de todas las cepas seleccionadas así como la de una cepa de referencia (*L. monocytogenes* ATCC 19115).

En el caso de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la empresa se observó que las cepas cultivadas previamente en CST tuvieron un mayor desarrollo en este sustrato, seguido por los sustratos a base de EV, teniendo un desarrollo similar en los sustratos a base de EV que contenían o no ácido peracético tuvieron. Algunas cepas (181-1, 475-2 y 575-2) mostraron un desarrollo similar tanto en CST como en EV. Por otro lado la cepa de referencia mostró menor capacidad de desarrollo en el EV que las cepas seleccionadas; este hecho pudiera atribuirse a que esta cepa a diferencia de las otras no fue aislada del ambiente de la planta procesadora.

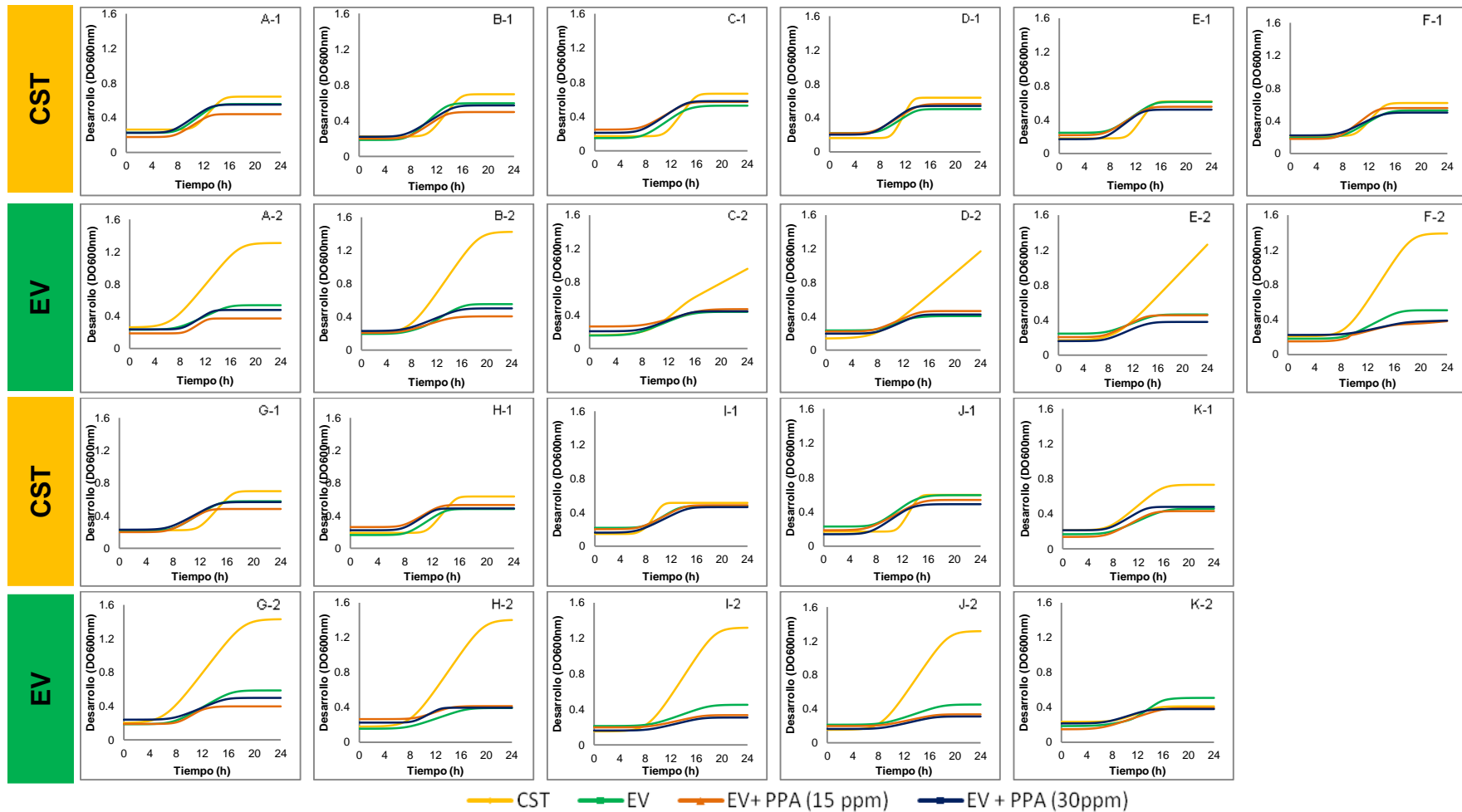


Figura 14. Comportamiento durante el desarrollo de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de una empresa de vegetales congelados y una cepa de referencia (ATCC 19115) en diferentes medios de cultivo, expuestas previamente a CST y EV. CST= caldo soya tripticasa, EV= extracto vegetal, PPA= ácido peracético. La letra seguida -1 significa que la cepa provenía de CST y de -2 que provenía de EV. A) cepa 7-2 B) cepa 124-1, C) cepa 140-1, D) cepa 142-1, E) cepa 181-1, F) cepa 389-, G) cepa 409-1, H) cepa 469-1, I) cepa 475-2, J) cepa 572-2, K) cepa ATCC 19115

De la misma forma las cepas que se expusieron previamente al EV tuvieron la misma tendencia de comportamiento que las expuestas a CST. Sin embargo cuando crecieron en el sustrato de referencia (CST) mostraron un aumento en la turbidez muy marcado, lo cual debido a que se empleó un método indirecto el aumento en la turbidez pudo verse alterada no solamente al crecimiento microbiano sino también por la posible síntesis de metabolitos.

En el caso de la cepa de referencia mostró un mayor desarrollo en el EV cuando provenía del mismo sustrato que cuando provenía de CST. Por lo cual se podría sugerir que la cepa de referencia se adaptó al sustrato aumentando su capacidad de desarrollo y densidad poblacional en el mismo.

A pesar que el método indirecto empleado nos ayudo para obtener el panorama general del comportamiento de las cepas, tiene algunas limitantes por lo cual se evaluó de manera simultánea el incremento de la población bacteriana a las 24 h empleando el método directo (recuento en placa). En la Figura 15 se observa el promedio de todas las cepas seleccionadas de la empresa de hortalizas congeladas observándose un mayor incremento poblacional en los sustratos a base del EV cuando provenían del EV que de CST, por lo cual podríamos decir que las cepas fueron adaptadas al sustrato..

Incluso se observó un mayor incremento poblacional en CST por parte del patógeno cuando provenía de un medio elaborado a partir de hortalizas que cuando provenía del mismo medio óptimo. Por lo cual es posible que al crecer en un medio con una menor calidad nutrimental que el de referencia se hayan activado algunas rutas metabólicas que le permitan usar de manera más eficiente los nutrientes del medio.

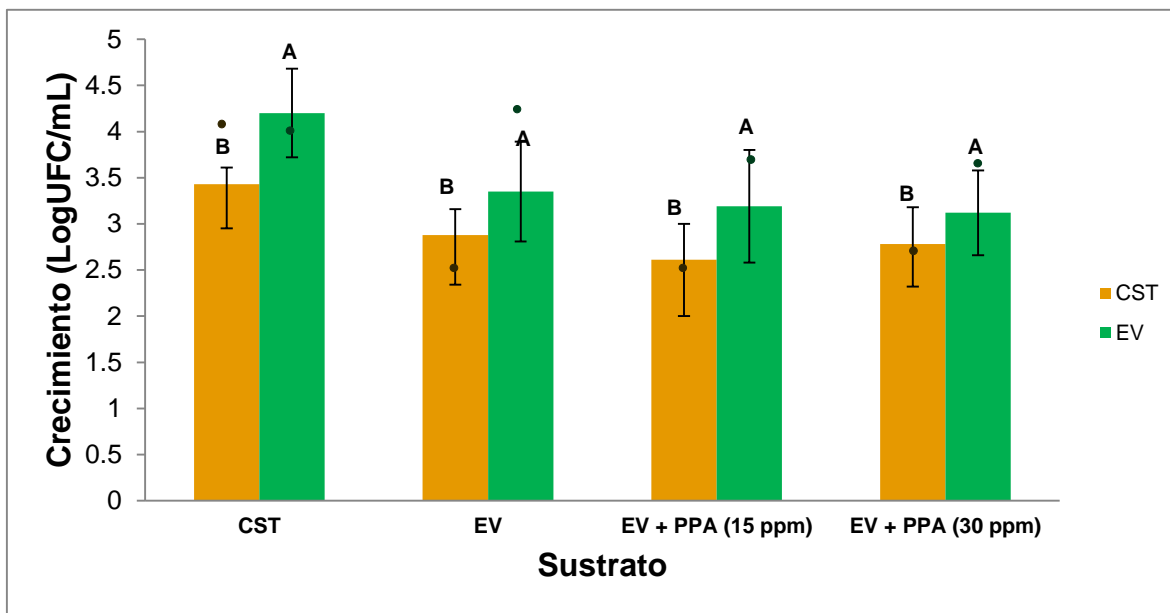


Figura 15. Efecto de la adaptación al sustrato sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en diversos medios de cultivo. CST= caldo soya tripticasa, EV= extracto vegetal, PPA= ácido peracético

Dentro de la gráfica también se observa en círculos el incremento que se obtuvo en los diferentes sustratos con células adaptadas y no al EV de la cepa de referencia. Observándose que hay una diferencia significativa en el incremento poblacional en los sustratos que tienen como base el EV cuando provienen del EV en comparación de cuando provienen de CST, observándose una adaptación en el sustrato.

Por otro lado, a partir de las graficas modeladas en DMFit se calcularon los parámetros de desarrollo (duración de la fase Lag, velocidad de desarrollo y máxima población alcanzada). La velocidad de desarrollo fue el parámetro que aportó los resultados más descriptivos y relevantes. El análisis de varianza de diferentes factores y sus interacciones dobles sobre la velocidad de desarrollo mostró que la historia previa de la célula (crecimiento previo en CST o EV), el tipo de sustrato y la interacción del tipo de cepa e historia previa de la célula tuvieron un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Efecto de diversos factores y algunas de sus interacciones sobre la velocidad de desarrollo de *L. monocytogenes*.

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F Radio	Prob>F
Tipo de cepa	1	0.0004	2.029	0.1557
Historia previa de la célula	1	0.01729	98.687	<0.0001*
Sustrato	3	0.1699	323.254	<0.0001*
Tipo de cepa*Historia previa de la célula	1	0.0007	4.226	0.0409*
Tipo de cepa* Sustrato	3	0.0013	2.478	0.0620
Historia previa de la célula*Sustrato	3	0.0006	1.154	0.3282

De manera general en todos los sustratos analizados las cepas que crecieron previamente en CST tuvieron una mayor velocidad de desarrollo que las de EV, esto puede atribuirse a que CST es un medio óptimo para el desarrollo bacteriano, por lo cual pudo haber permitido que la células se encontraran en un estado óptimo al ponerse en contacto con los nuevos sustratos (Figura 16).

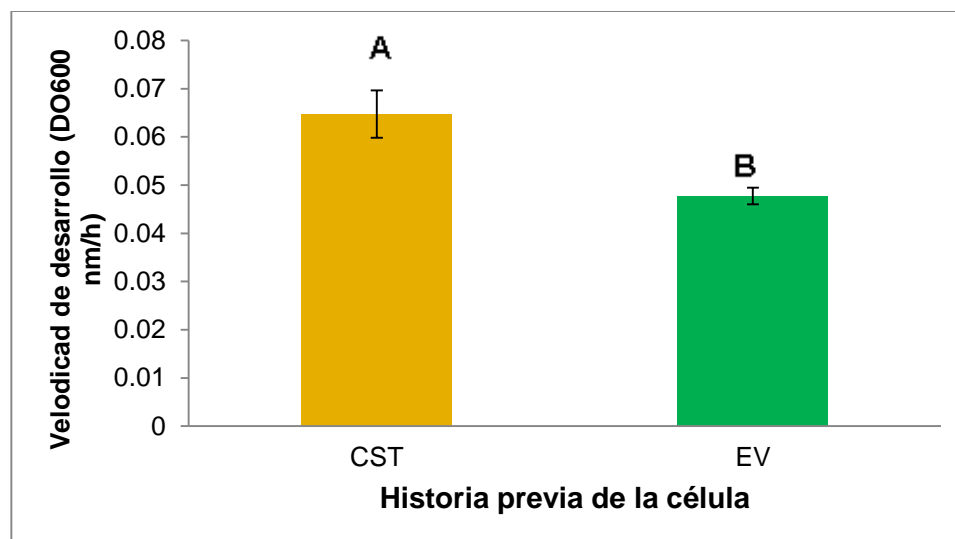


Figura 16. Efecto de la historia previa de la célula sobre la velocidad de desarrollo de *L. monocytogenes*.

De la misma forma la velocidad de desarrollo en todas las cepas fue mayor cuando se empleo como sustrato CST, mientras que en los sustratos a base del EV no se observaron diferencias significativas (Figura 17). La falta de diferencia en la velocidad de desarrollo entre los sustratos que tenían como base EV, se pudo deber a la inactivación del ácido peracético en el EV por la presencia de materia orgánica

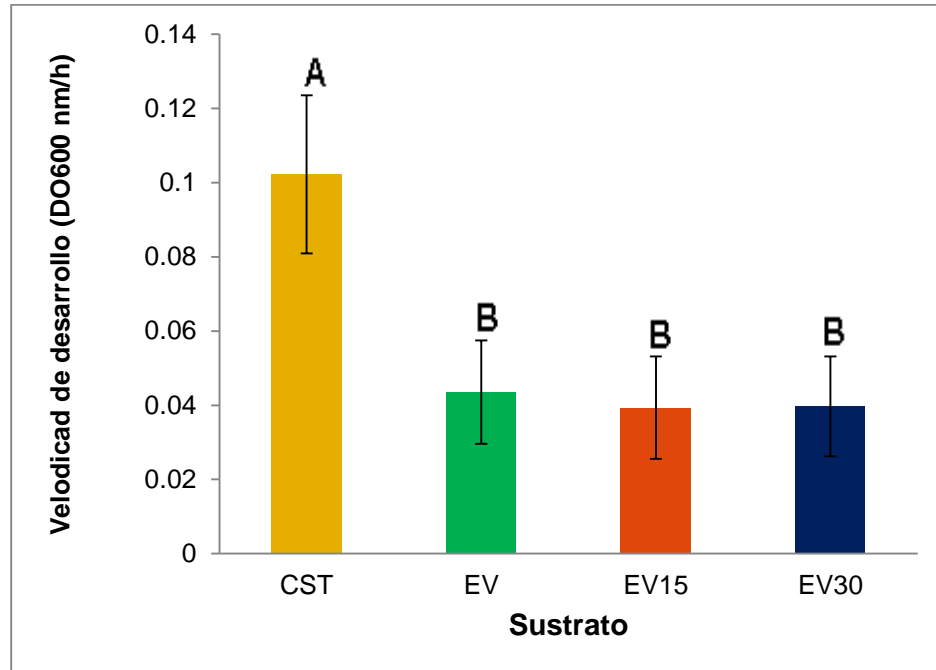


Figura 17. Efecto del sustrato sobre la velocidad de desarrollo de *L. monocytogenes*.

En la Figura 18 se observan las dinámicas de inactivación de 15 y 30 ppm de ácido peracético en el EV cuando estaba inoculado o no con el patógeno, encontrándonos un comportamiento similar de inactivación del desinfectante tanto en los sustratos con mayor concentración del ácido peracético como en los que estaban inoculados o no, lo que nos indica que la inactivación de ácido peracético se debe a la presencia de materia orgánica en el sustrato.

A pesar de la inactivación de este desinfectante en el EV en el tiempo aun después de 12 h se encuentran concentraciones mínimas del mismo lo que también

sugieren que las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la empresa tienen la capacidad de crecer a concentraciones traza de este desinfectante y adaptarse al sustrato ya que fueron capaces de seguir desarrollando de manera similar que cuando este no estaba presente.

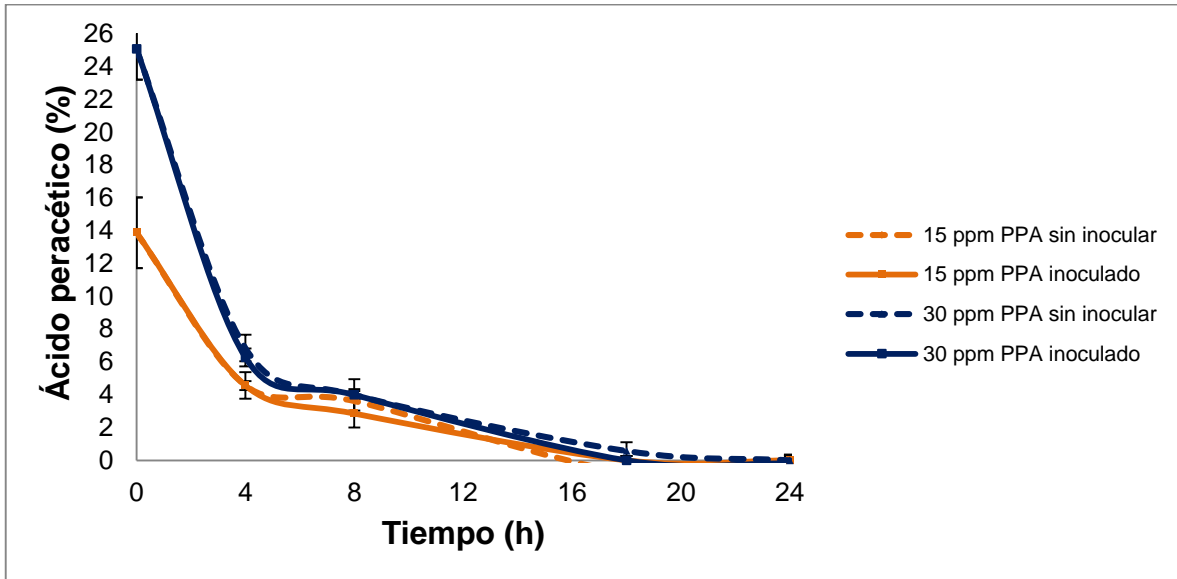


Figura 18. Cinética de inactivación del ácido peracético respecto al tiempo en el EV inoculado y no con *L. monocytogenes* PPA= Ácido peracético

En el caso de la interacción entre el tipo de cepa y la historia previa de la célula se pudo observar que las cepas tolerantes al ácido peracético tuvieron una mayor velocidad de desarrollo cuando provenían del EV en comparación con las cepas susceptibles. Esto pudiera deberse a que posiblemente dichas cepas al estar previamente expuestas a condiciones estresantes de acuerdo al sitio de aislamiento y adquirir una mayor tolerancia a este desinfectante, activaron algunos mecanismos anti-estrés los cuales pudieron haberles permitido tener una mayor facilidad de desarrollar en un medio con una baja concentración de nutrientes (Figura 19).

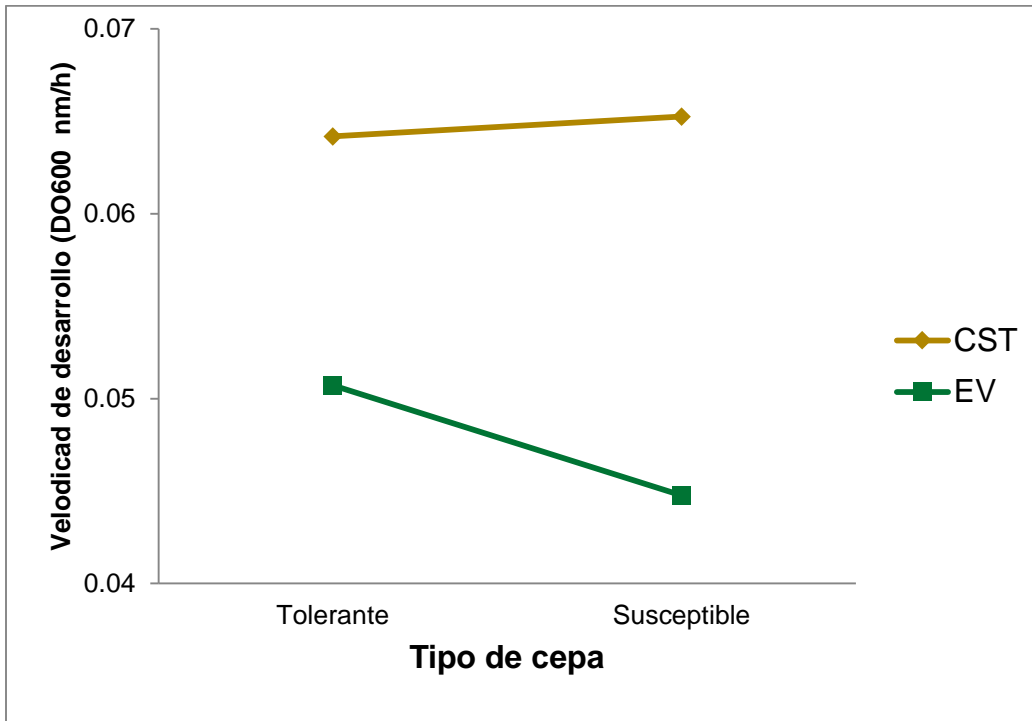


Figura 19. Efecto de la interacción entre el tipo de cepa y la historia previa de la célula sobre la velocidad de desarrollo de *L. monocytogenes*.

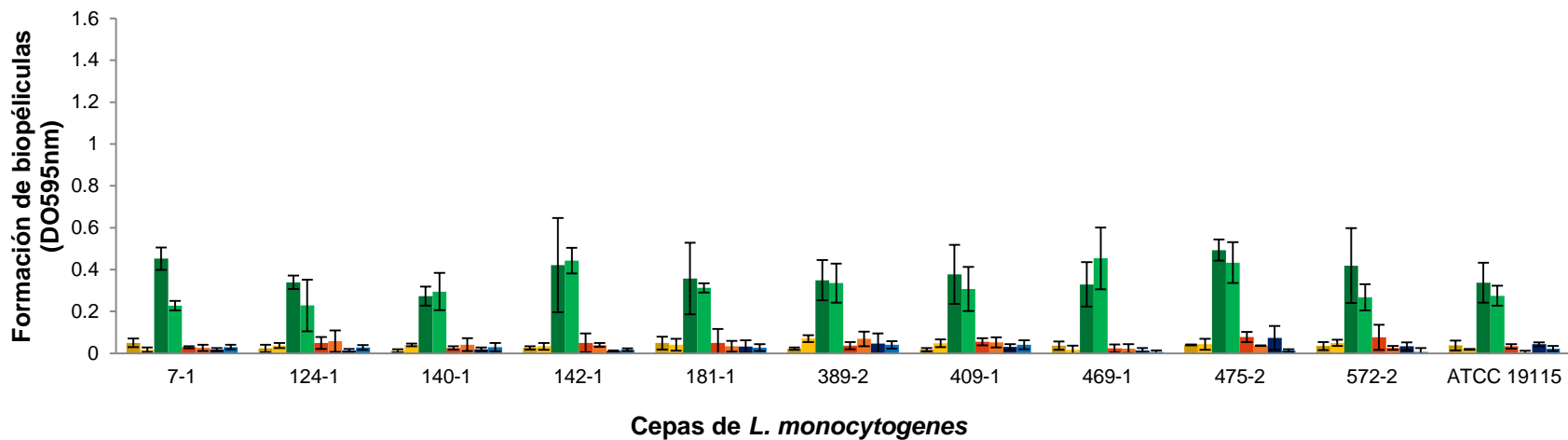
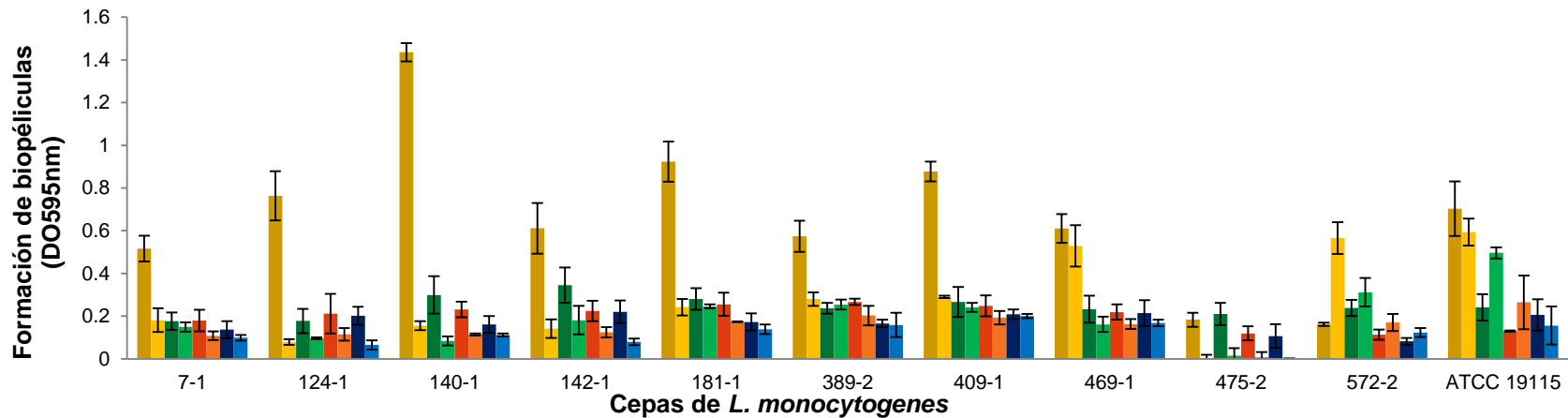
6.5 Efecto de la adaptación al sustrato de células *L. monocytogenes* sobre su capacidad de formar biopelículas

L. monocytogenes inmersas en biopelículas es más resistentes a diversos factores como la exposición a desinfectantes (Frank y Koffi, 1999), por lo cual en esta condición puede aumentar su persistencia dentro de plantas procesadoras de alimentos.

En este estudio se evaluó la capacidad de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la planta procesadora de hortalizas congeladas para formar biopelículas. Los factores que se evaluaron fueron las condiciones de almacenamiento (25°C/ 2 días y 4°C/ 7 días), el tipo de cepa (tolerante o susceptible a ácido peracético), la historia previa de la célula (adaptada o no al EV) y el tipo de sustrato empleado para su desarrollo (CST, EV sólo y adicionado con 15 y 30 ppm de ácido peracético).

En la Figura 20 se observa la formación de biopelículas a 25°C y 4°C cuando las cepas de *L. monocytogenes* se cultivaron previamente en CST y EV. La mayor producción de biopelículas por parte de las cepas de este patógeno ocurrió a 25°C cuando se usó CST como sustrato y las cepas habían sido cultivadas previamente en este mismo sustrato, observándose que la cepa 140-1, seguida de las cepas 181-1 y 409-1 se destacaron por ser las mayores productoras. Por otro lado cuando se empleó el EV como sustrato tanto las cepas activadas previamente en CST como en EV tuvieron una baja producción de biopelículas. Por otra parte cuando las cepas fueron almacenadas a 4°C se observó de manera general una formación de biopelículas más baja que cuando fue almacenada a 25°C en todos los sustratos a excepción del EV tanto en las células adaptadas como no adaptadas al sustrato.

Diversos estudios reportan una amplia variación en la formación de biopelículas por *L. monocytogenes* en diferentes sustratos (Djordjevic *et al.* 2002, Moltz and Martin, 2005). Djordjevic *et al.* (2002) atribuye que la diferencia en la formación de biopelícula puede deberse al linaje al cual pertenece la cepa, mientras que Nilsson y Bowman (2011) encontraron que el origen del aislamiento puede ser un factor que afecta la producción de biopelículas, sin embargo es algo que hasta el momento no se encuentra elucidado. En este estudio no se observó que las cepas pertenecientes al pulstotipo B, consideradas como persistentes tuvieran una mayor formación de biopelículas que las pertenecientes a los pulstotipos G y E, consideradas como esporádicas. En la revisión literaria realizada por Ferreira *et al.* (2014) se debatió sobre las diversas hipótesis propuestas para explicar la persistencia de cepas en los ambientes del procesamiento de alimentos. Entre estas hipótesis se hace mención a que las cepas persistentes producían una mayor cantidad de biopolímeros. En algunos estudios efectivamente se ha encontrado que las cepas persistentes son significativamente mayores productoras de biopelículas mientras que en otros no se ha encontrado diferencia entre cepas persistentes y esporádicas. Lo que nos indica que la formación de biopelículas no es la única característica que influye en la persistencia de este patógeno.



■ CST/ CST*
 ■ EV/ CST
 ■ CST/ EV
 ■ EV/ EV
 ■ CST/ EV + PPA (15 ppm)
 ■ EV/ EV + PPA (15 ppm)
 ■ CST/ EV+ PPA (30 ppm)
 ■ EV/ EV+ PPA (30 ppm)

Figura 20. Formación de biopelículas en microplaca por cepas de *L. monocytogenes* expuestas previamente a CST y EV. A) Almacenadas a 25°C durante 2 días, B) Almacenadas a 4°C durante 7 días. * El primer medio de cultivo indica de que medio procedencia de la célula / el segundo indica el sustrato empleado. CST: caldo soya tripticasa; EV: extracto vegetal; PPA = ácido peracético.

En este estudio se encontró que no sólo un factor afecta la formación de biopelículas, sino que la generación de esta matriz polimérica por *L. monocytogenes* esta influenciada por diversos factores tanto extrínsecos, intrínsecos como las interacciones de estos.

En el Cuadro 13 se observa el analisis de varianza de los factores y las interacciones de estos que influyen sobre la formación de biopelículas. Las interacciones que resultaron estadísticamente significativas fueron: tipo de cepa e historia previa de la célula, historia previa de la célula y las condiciones de almacenamiento, historia previa de la célula y el sustrato empleado y la condición de almacenamiento y el sustrato.

Cuadro 13. Efecto de diversos factores y sus interacciones sobre la formación de biopelículas por *L. monocytogenes*.

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F Radio	Prob>F
Tipo de cepa	1	0.020	1.326	0.2552
Historia previa de la célula	1	0.837	54.486	<0.0001*
Condición de almacenamiento	1	2.007	130.600	<0.0001*
Sustrato	3	3.529	76.554	<0.0001*
Tipo de cepa* Historia previa de la célula	1	0.163	10.610	0.0012*
Tipo de cepa*Condición de almacenamiento	1	0.045	2.908	0.0888
Tipo de cepa*Sustrato	3	0.011	0.246	0.8638
Historia previa de la célula*Condición de almacenamiento	1	0.588	38.260	<0.0001*
Historia previa de la célula*Sustrato	3	0.610	13.238	<0.0001*
Condición de almacenamiento *Sustrato	3	4.818	104.511	<0.0001*

En el caso de la primera interacción, tipo de cepa e historia previa de célula se observan que cuando las cepas de *L. monocytogenes* tanto tolerantes como susceptibles a ácido peracético son cultivadas previamente en CST no muestran una diferencia significativa en su formación de biopelículas entre ellas. Sin embargo cuando estas cepas crecieron previamente en el EV se observa una mayor formación de biopelículas por parte de las cepas tolerantes al desinfectante. Este comportamiento pudiera deberse a las mismas razones que se discutieron cuando se observó una mayor velocidad de desarrollo por parte de las cepas tolerantes a ácido peracético (Figura 21).

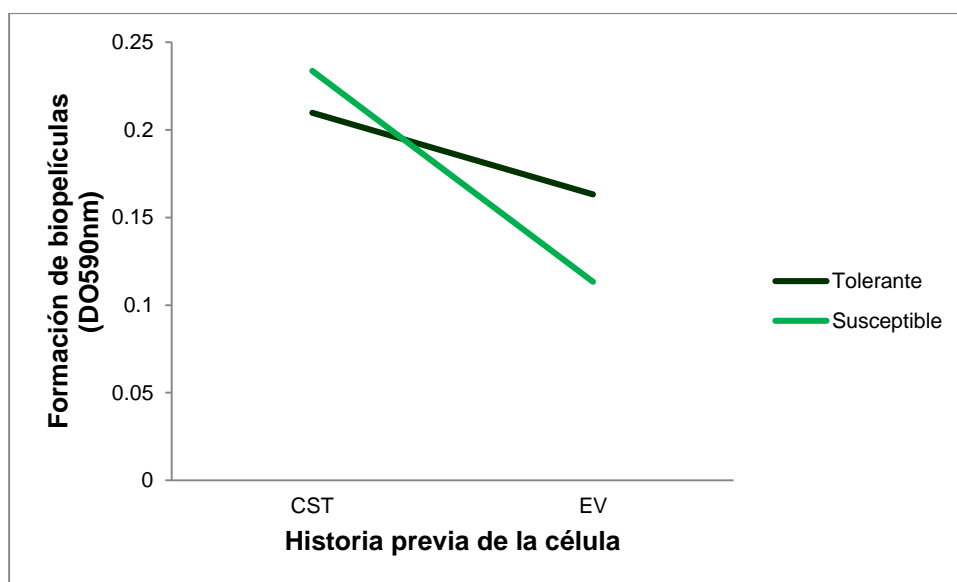


Figura 21. Efecto de la interacción entre el tipo de cepa y la historia previa de la célula en la formación de biopelículas por cepas de *L. monocytogenes*.

En la Figura 22 se observa la interacción entre las condiciones de almacenamiento y la historia previa de la célula en la formación de biopelículas por cepas de *L. monocytogenes*, mostrando que en condiciones óptimas (25°C) de almacenamiento se observa una diferencia marcada entre las células que fueron adaptadas y no al sustrato previamente, pero este efecto no se observa en condiciones de refrigeración (4°C), ya que para ambos tipos de células la producción de biopelículas es baja en estas condiciones. Esto concuerda con lo reportado por Nilsson *et al.* (2011), quienes demostraron que el incremento en la

producción de biopelículas por parte de *L. monocytogenes* estaba relacionada con el incremento en la temperatura de incubación. Por lo cual muy probablemente como a condiciones bajas de temperatura la producción de biopelículas es poca no se logra apreciar si existe o no una mayor producción de biopelículas cuando las cepas son adaptadas al sustrato.

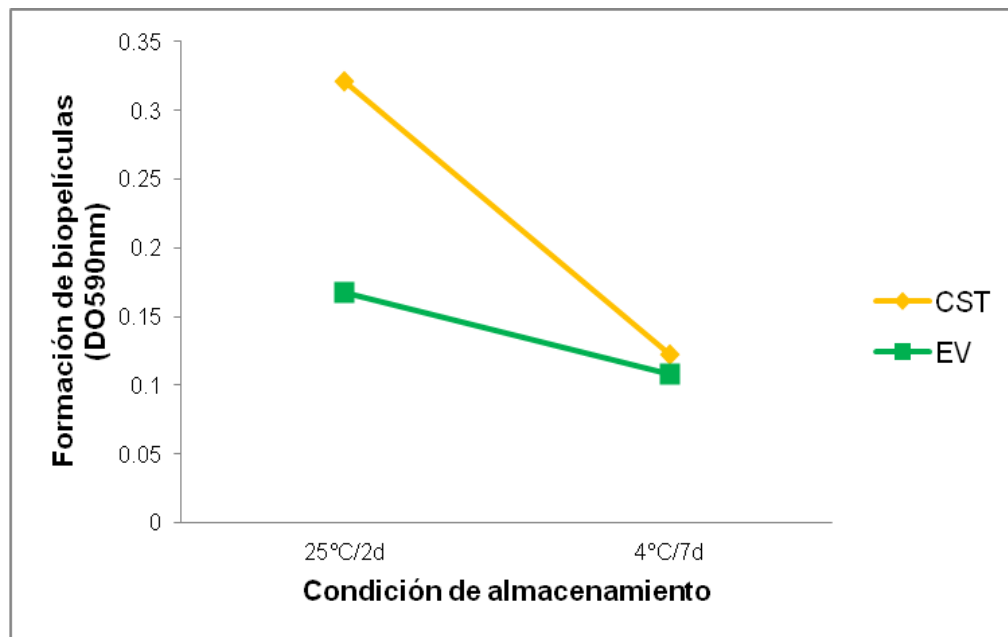


Figura 22. Efecto de la interacción entre las condiciones de almacenamiento y la historia previa de la célula en la formación de biopelículas por cepas de *L. monocytogenes*.

La interacción entre el sustrato empleado y la historia previa de la célula, también fue significativa; las cepas de *L. monocytogenes* produjeron la mayor cantidad de biopelículas cuando el CST se empleó como medio de cultivo en la células que habían crecido previamente en este medio óptimo (Figura 23), lo que sugiere que el medio de crecimiento tiene un efecto sobre la formación de estos biopolímeros por parte del patógeno. Resultados similares han sido reportados por Folsom *et al.* (2006) quienes observaron una mayor producción de biopelículas en un medio rico en nutrientes.

A pesar que diversos investigadores mencionan que la formación de biopelículas esta influenciada por las condiciones ambientales incluyendo el nivel

nutricional del medio (Nilsson *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2009), este factor no es el único que puede afectar, ya que en este estudio se observó que las células que fueron expuestas previamente a EV, fue en este sustrato donde mostraron una mayor formación de biopelículas dejando en segundo lugar al CST.

Por otra parte en los sustratos a base del EV con 15 y 30 ppm de ácido peracético se observó tanto en las células adaptadas como no al sustrato una baja y casi nula producción de biopelículas.

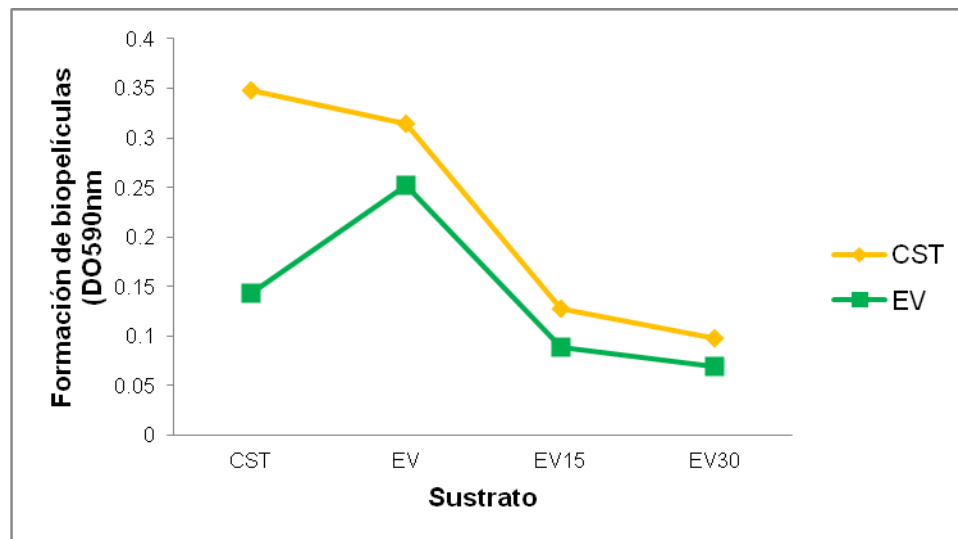


Figura 23. Efecto de la interacción entre la historia previa de la célula y el sustrato empleado en la producción de biopelículas por cepas de *L. monocytogenes*

Blackman y Frank (1996) encontraron que el efecto de la temperatura sobre la formación de biopelículas por *L. monocytogenes* varía de acuerdo a la superficie y al medio, lo que podría explicar de manera más clara la interacción entre las condiciones de almacenamiento y el sustrato empleado en donde se observa que en las condiciones óptimas (25°C/2 d) de incubación en todos los sustratos hay una mayor formación de biopelículas que a las condiciones de 4°C/ 7d a excepción de cuando se usa el EV como sustrato a condiciones de refrigeración siendo mayor la producción en este medio a 4°C que a 25°C (Figura 24).

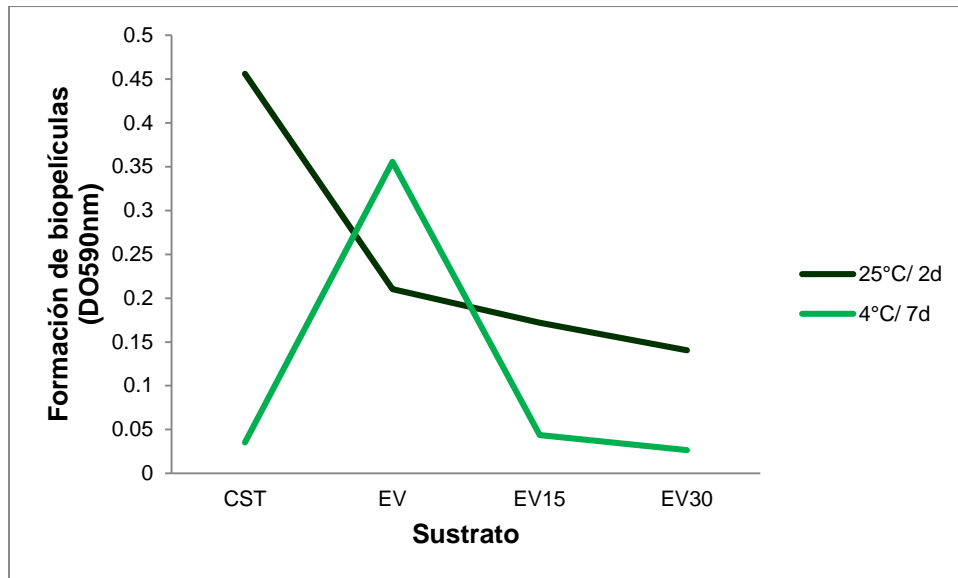
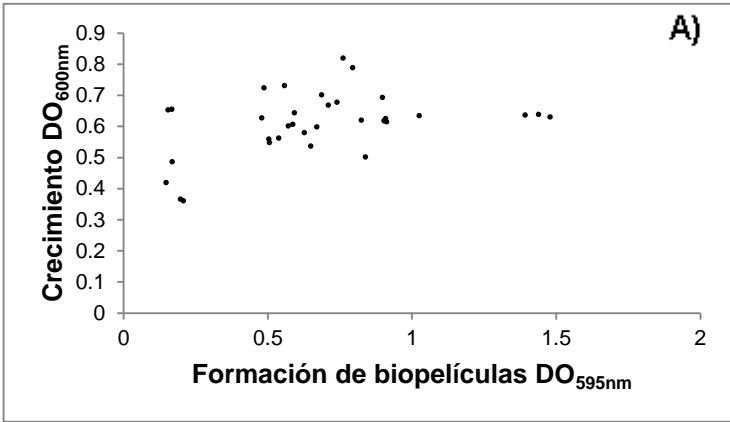
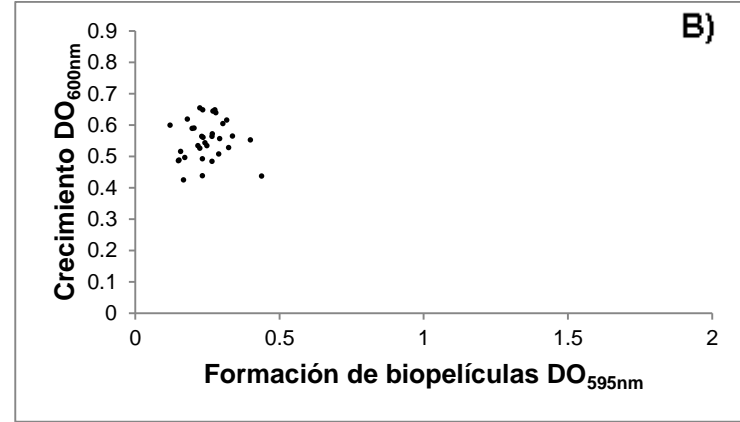


Figura 24. Efecto de la interacción entre el sustrato y las condiciones de almacenamiento en la producción de biopelículas por cepas de *L. monocytogenes*

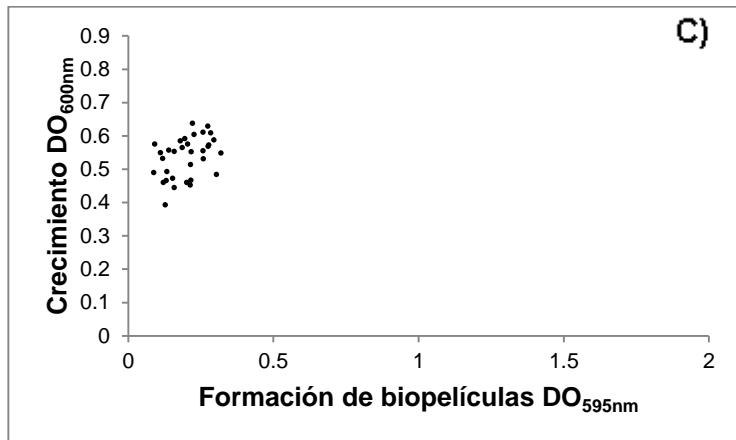
Finalmente, se evaluó la correlación entre el desarrollo bacteriano y la formación de biopelículas. Se observó que hay una correlación baja en todos los tratamientos, por lo cual se puede decir que la formación de biopelículas es independiente del crecimiento bacteriano (Figura 25, 26, 27, 28). Este hecho reafirma que no necesariamente el medio que promueve de mejor forma el desarrollo bacteriano, es aquel en el que se produce una mayor cantidad de biopelículas, ya que la formación de las mismas no depende únicamente de esta característica. Estos resultados son similares a lo reportado por Djordjevic *et al.* (2002) y Folsom *et al.* (2006), quienes también encontraron una correlación baja entre la formación de biopelículas y la densidad bacteriana.



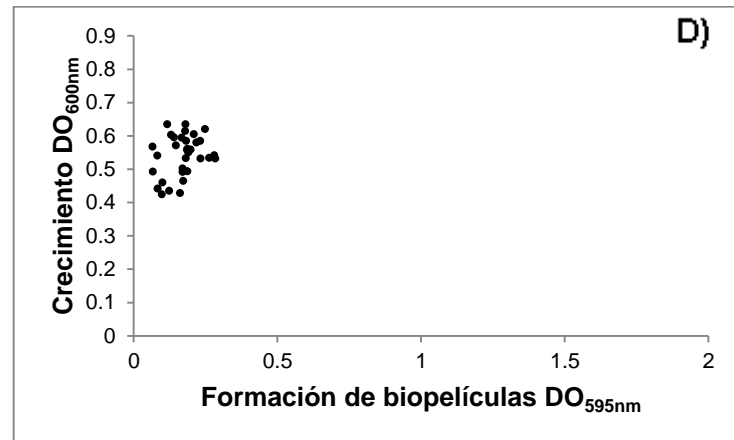
$R^2=0.1638$



$R^2=0.0018$

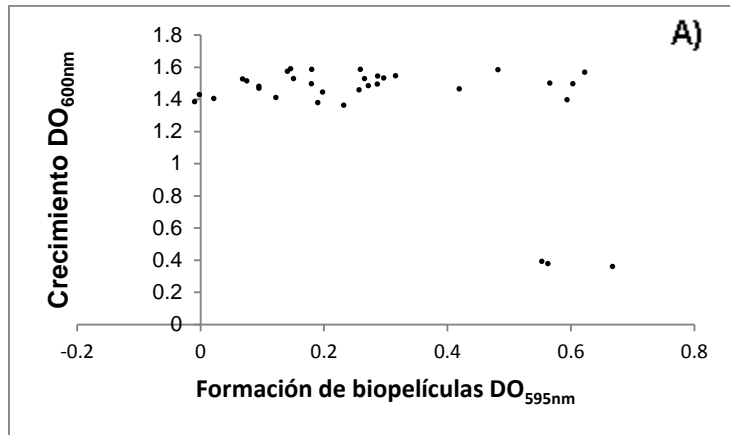


$R^2=0.1699$

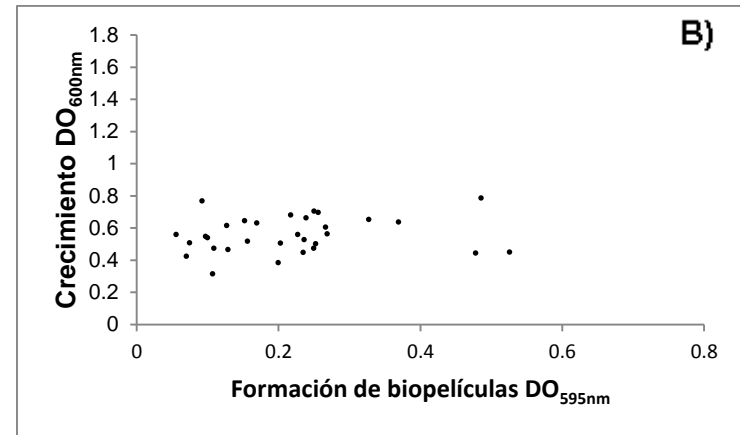


$R^2=0.0915$

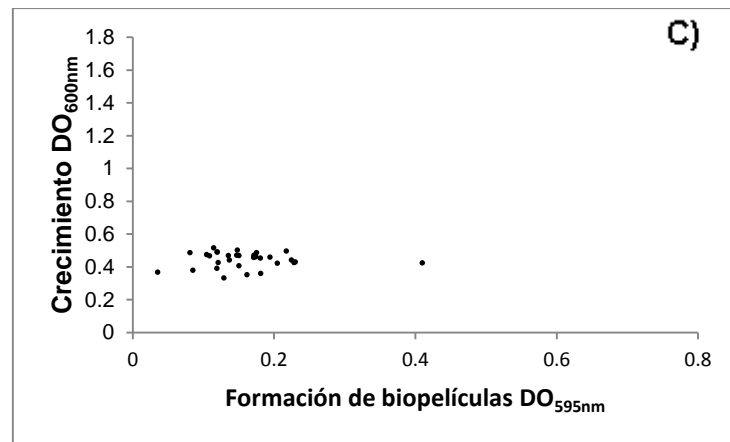
Figura 25. Correlación entre el crecimiento y la formación de biopelículas a 25°C durante 2 días por células de *L. monocytogenes* expuestas previamente a CST. En el estudio se incluyeron las 10 cepas seleccionadas y aisladas de la empresa y la cepa ATCC 19115. A) CST; B) Extracto vegetal; C) Extracto vegetal adicionado con 15 ppm de ácido peracético; D) Extracto vegetal adicionado con 30 ppm de ácido peracético.



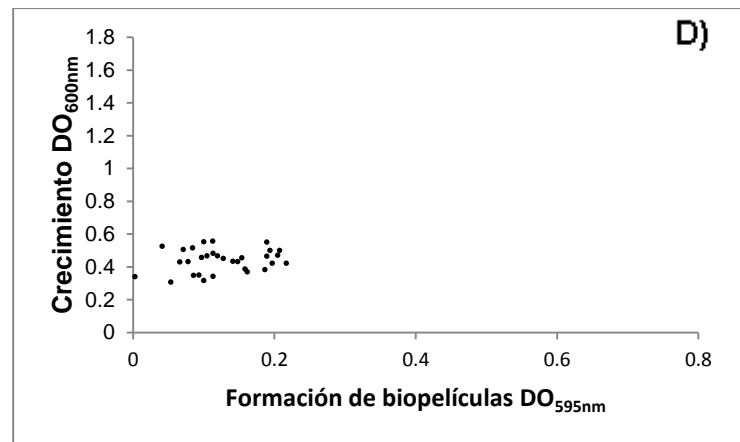
$R^2=0.2153$



$R^2=0.0284$

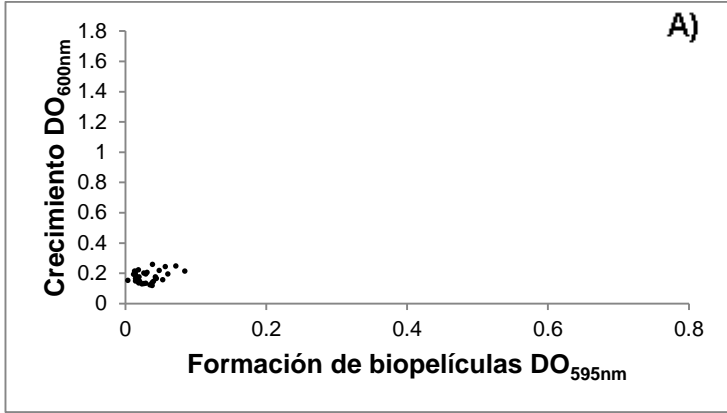


$R^2=0.0333$

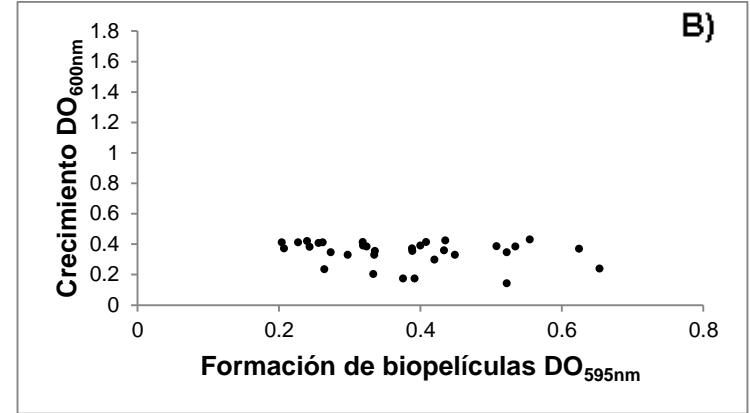


$R^2=0.115$

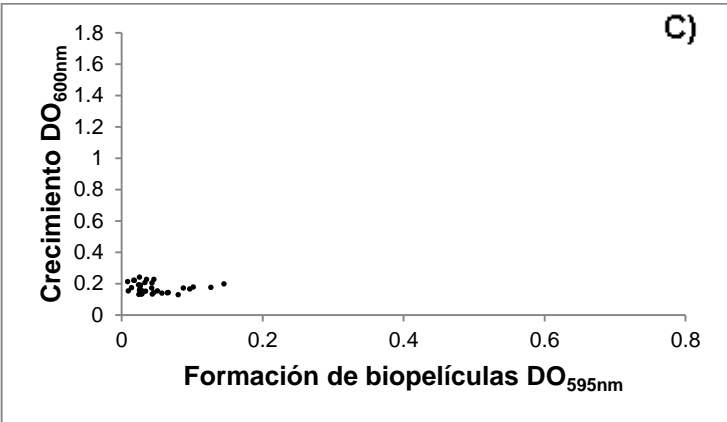
Figura 26. Correlación entre el crecimiento y la formación de biopelículas por *L. monocytogenes* expuesta previamente a EV a 25°C durante 2 días. En el estudio se incluyeron las 10 cepas seleccionadas y aisladas de la empresa y la cepa ATCC 19115. A) CST; B) Extracto vegetal; C) Extracto vegetal adicionado con 15 ppm de ácido peracético; D) Extracto vegetal adicionado con 30 ppm de ácido peracético.



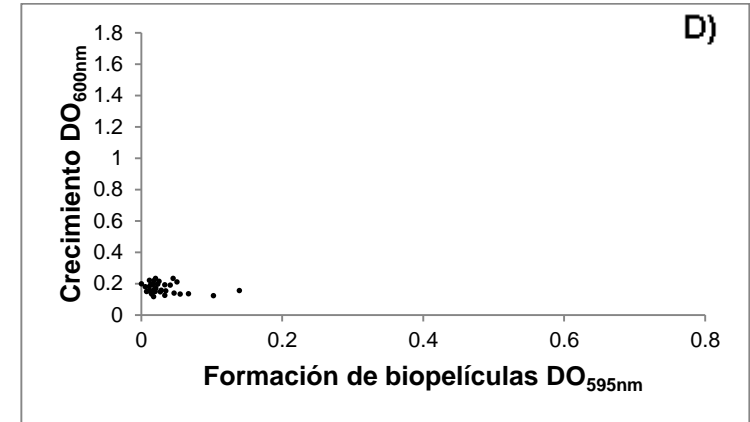
$R^2=0.092$



$R^2=0.0487$

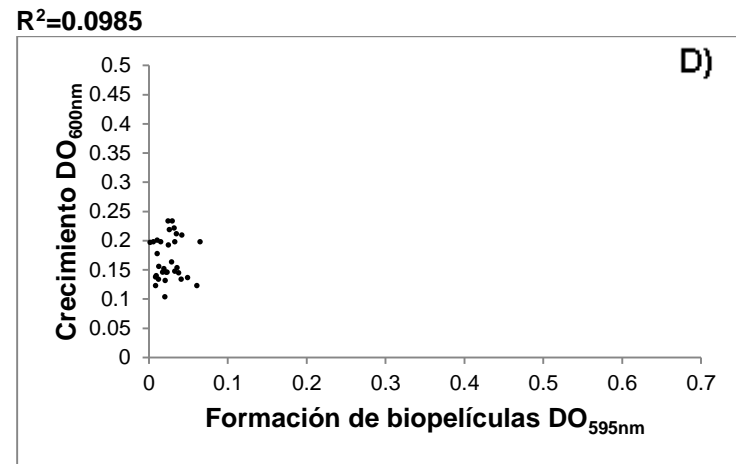
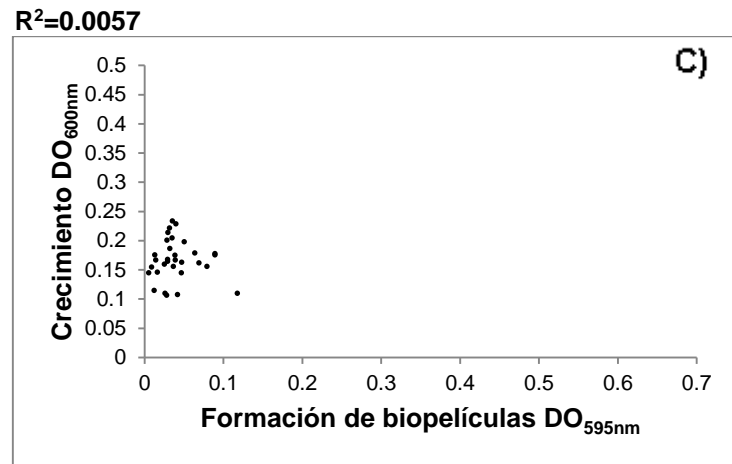
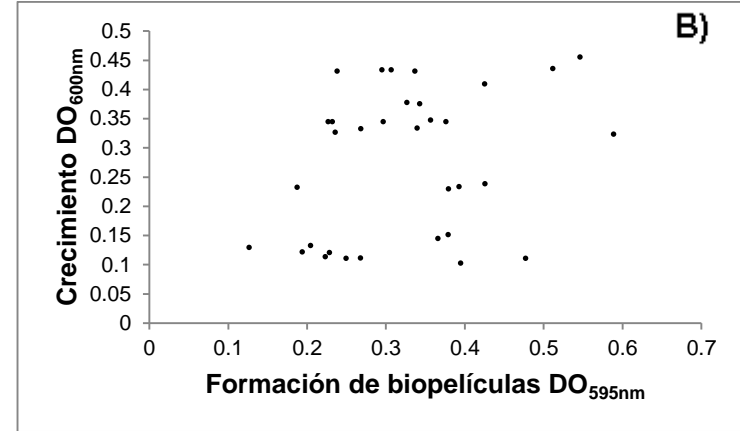
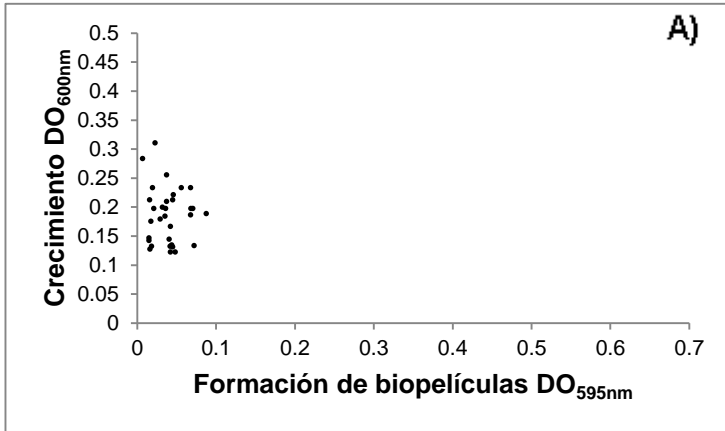


$R^2=0.0122$



$R^2=0.0608$

Figura 27. Correlación entre el crecimiento y la formación de biopelículas por *L. monocytogenes* expuesta previamente a CST a 4°C durante 7 días. En el estudio se incluyeron las 10 cepas seleccionadas y aisladas de la empresa y la cepa ATCC 19115. A) CST; B) Extracto vegetal; C) Extracto vegetal adicionado con 15 ppm de ácido peracético; D) Extracto vegetal adicionado con 30 ppm de ácido peracético.



$R^2=0.02$

$R^2=0.0015$

Figura 28. Correlación entre el crecimiento y la formación de biopelículas por *L. monocytogenes* expuesta previamente a EV a 4°C durante 7 días. En el estudio se incluyeron las 10 cepas seleccionadas y aisladas de la empresa y la cepa ATCC 19115. A) CST; B) Extracto vegetal; C) Extracto vegetal adicionado con 15 ppm de ácido peracético; D) Extracto vegetal adicionado con 30 ppm de ácido peracético.

6.6 Efecto de la adaptación al sustrato de células de *L. monocytogenes* sobre su capacidad de desarrollo y de resistencia a la desinfección y escaldado

Esta serie de experimentos se realizaron en el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA) en Lleida, España. La finalidad fue evaluar si la adaptación al sustrato en cepas de *L. monocytogenes* tienen un efecto sobre su resistencia a tratamientos que se aplican durante la producción de hortalizas congeladas.

6.6.1 Efecto del sustrato y la temperatura de incubación sobre el desarrollo de *L. monocytogenes*

Primeramente se evaluó el comportamiento de cinco cepas de *L. monocytogenes* en EV¹, para determinar si estas cepas crecían en un medio similar al que podría encontrarse en los equipos y ambiente de una planta procesadora de hortalizas. Como se ha venido mencionando la capacidad de desarrollo de las bacterias depende de diversos factores siendo el medio de cultivo y la temperatura de incubación los más importantes.

En la Figura 29 se puede observar las dinámicas modeladas del crecimiento mediante el programa DMFit de la mezcla de cepas de *L. monocytogenes* en dos diferentes medios de cultivo (CSTEL y EV¹) incubados a 25 y 4°C. En ambas figuras se observa que el mejor medio para el desarrollo del patógeno fue el CSTEL, ya que este es un medio que contiene los nutrientes esenciales para el desarrollo bacteriano y un pH neutro (pH=7.2), mientras que el EV¹ no contiene la misma cantidad y calidad de nutrientes, además de tener un pH ligeramente lejos del óptimo (pH=6.34). El mayor crecimiento del patógeno ocurrió a 25°C, mientras que a 4°C el desarrollo fue más lento.

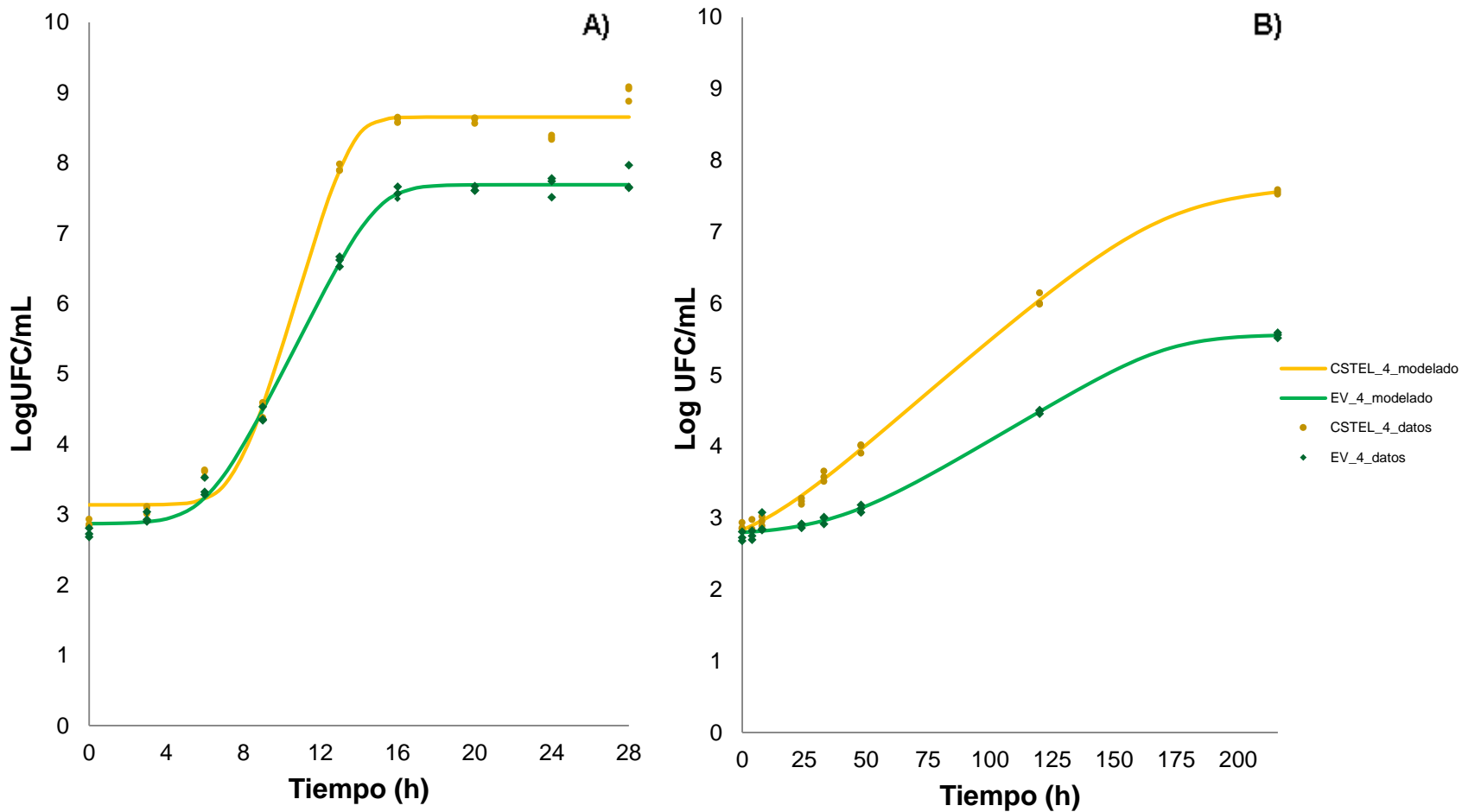


Figura 29. Grafica modelada del comportamiento de *L. monocytogenes* en dos diferentes sustratos durante el tiempo. **A) 25°C, B) 4°C.** Los puntos representan los datos obtenidos el desarrollo de *L. monocytogenes* en los dos diferentes sustratos conforme al tiempo y las líneas continuas representan las dinámicas de crecimiento modeladas mediante el programa DMFit.

Lo mencionado anteriormente puede ser corroborado al observar que la velocidad de desarrollo y la máxima población alcanzada es mucho menor en el EV¹ que en CSTEEL así como a 4°C que a 25°C (Cuadro 14). Robinson *et al.* (1998) observaron un cambio importante en la tasa de crecimiento al variar el pH entre 6 y 7, por lo que pudiera ser este factor uno de los que tiene más efecto en el desarrollo del patógeno cuando se comparan los dos medios.

La fase Lag es una de las variables más interesantes a analizar pero difícil de predecir ya que depende del estado fisiológico del inóculo como de las condiciones de crecimiento (Robinson *et al.*, 1998). Debido a que el patógeno había sido expuesto previamente al EV¹ a 25°C se observa que la fase Lag fue similar e incluso estadísticamente menor que la observada en CSTEEL. Esto puede deberse a la pre-adaptación realizada al exponer previamente el patógeno al sustrato, debido a que este paso puede llegar a reducir drásticamente los tiempos de adaptación (Dufrenne *et al.*, 1997). Sin embargo, cuando este patógeno es expuesto de manera simultánea a dos situaciones de estrés (temperatura baja y medio no óptimo) se observa un incremento importante en la duración de la fase Lag.

Comparando este estudio con los experimentos que se realizaron en México se observó que a las 24 h de incubación las cepas de *L. monocytogenes* empleadas en ambos estudios tuvieron un comportamiento similar a pesar de que la elaboración del extracto vegetal fue diferente. Las cepas aisladas de la empresa y estudiadas en México crecieron en promedio 8.31 y 7.26 Log UFC/mL en CST y EV, mientras que las cepas empleadas en España crecieron aproximadamente 8.65 y 7.69 Log UFC/mL en CSTEEL y EV¹, respectivamente.

Cuadro 14. Parámetros de desarrollo de *L. monocytogenes* en dos diferentes sustratos durante el almacenamiento a 25 y 4°C.

Parámetro de crecimiento	Medio de cultivo	Temperatura (°C)	
		25	4
Velocidad de desarrollo (Log UFC/mL)/h	CSTEL	0.906 ± 0.058 ^{Aa}	0.315 ± 0.002 ^{Ba}
	EV ¹	0.543 ± 0.007 ^{Ab}	0.205 ± 0.002 ^{Bb}
Fase Lag	CSTEL	7.54 ± 0.27 ^{Ba}	12.03 ± 1.28 ^{Ab}
	EV ¹	6.08 ± 0.05 ^{Bb}	37.11 ± 9.13 ^{Aa}
Máxima población alcanzada	CSTEL	8.65 ± 0.4 ^{Aa}	7.74 ± 0.25 ^{Ba}
	EV ¹	7.69 ± 0.8 ^{Ab}	5.56 ± 0.03 ^{Bb}

Los resultados son el promedio de tres replicas ± la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes expresan una diferencia estadísticamente significativa entre los medios de cultivo a la misma temperatura. Letras mayúsculas diferentes expresan una diferencia estadísticamente significativa en el mismo medio incubado a diferente temperatura.

6.6.2 Efecto de la adaptación al sustrato sobre la adherencia de *L. monocytogenes* a hortalizas frescas.

La capacidad de adherencia de *L. monocytogenes* a las hortalizas frescas es un importante factor a tomar en cuenta debido a que esto influye en la cantidad de materia prima que puede llegar contaminada a las empresas procesadoras, la concentración en la cual se puede encontrar el patógeno en dichos productos, así como la capacidad de generar una contaminación indirecta dentro de las plantas procesadoras. Tanto los factores intrínsecos de las hortalizas (integridad física y homogeneidad de la superficie) como los factores intrínsecos del microorganismo (número de microorganismos, adaptación al sustrato, estado fisiológico) afectan la capacidad de adherencia de los microorganismo en hortalizas (Burnett y Beuchat, 2001; Sapers, 2001; Lamikanra, 2002; Sapers *et al.*, 2006; Collignon y Korsten, 2010). En el Cuadro 15 se observan los porcentajes de adherencia de *L. monocytogenes* a brócoli, coliflor y zanahoria. En los dos primeros productos cuando las células provenían del EV¹ hay un mayor porcentaje de adherencia que

cuando provenían de CSTEL, lo que podría indicar que al adaptarse las células previamente a sustratos similares aumenta la capacidad de adherencia del patógeno. En el caso de la zanahoria el porcentaje de adherencia fue menor respecto a las otras hortalizas aunque igual para ambos tipos de células (células de *L. monocytogenes* adaptadas y no adaptas al sustrato). La baja adherencia del patógeno a la zanahoria pudiera deberse a los agentes antimicrobianos que se encuentran en este producto (Beuchat y Brackkett 1990; Babic *et al.*, 1994; Palma-Quiroz *et al.*, 2013), lo cual pudiera haber enmascarado el efecto de la adaptación al sustrato.

Cuadro 15. Porcentaje de adherencia en hortalizas frescas de células de *L. monocytogenes* cultivadas en diferentes medios de cultivo

Producto	CSTEL	EV ¹
Brócoli	3.78 ± 1.88 ^b	40.32 ± 12.92 ^a
Coliflor	2.52 ± 0.47 ^b	12.52 ± 8.86 ^a
Zanahoria	0.35 ± 0.36 ^a	0.59 ± 0.67 ^a

Los resultados son el promedio de seis replicas ± la desviación estándar de dos estudios independientes con tres replicas cada uno. En el mismo producto letras diferentes expresan una diferencia estadísticamente significativa entre los medios de cultivo.

6.6.3 Efecto de la adaptación al sustrato de células de *L. monocytogenes* inoculadas en hortalizas sobre su resistencia a la desinfección y escaldado

En las Figuras 30, 31 y 32 se observan las reducciones de células de *L. monocytogenes* inoculada en brócoli, coliflor y zanahoria, respectivamente, al ser sometidas a tratamientos de desinfección a 63 ppm de ácido peracético a diferentes tiempos así como la reducción obtenida por arrastre mecánico (exposición 60 s en agua desionizada). De manera general en todos los productos se observaron mayores reducciones por parte del patógeno al aplicar las soluciones desinfectantes cuando *L. monocytogenes* había sido adaptaba previamente al sustrato.

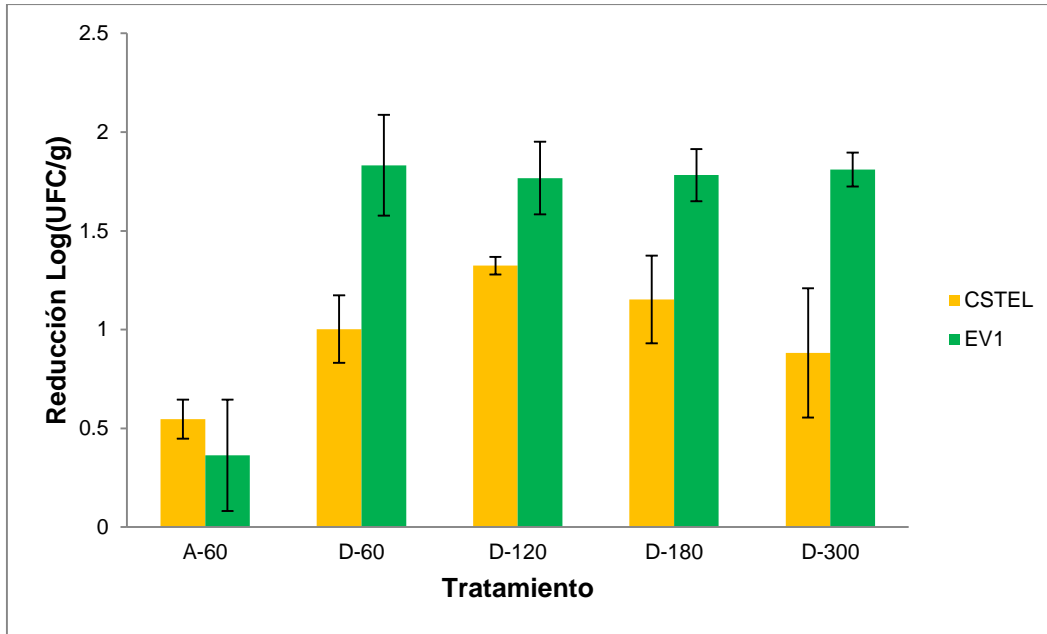


Figura 30. Reducción en la población de *L. monocytogenes* cultivada en CSTEL y EV¹ por efecto de la desinfección de brócoli crudo. A-60: agua desionizada durante 60 s (arrastre mecánico). D-60: 63 ppm de ácido peracético durante 60 s; D-120: 63 ppm de ácido peracético durante 120 s. D-180: 63 ppm de ácido peracético durante 180 s; D-300: 63 ppm de ácido peracético durante 300 s.

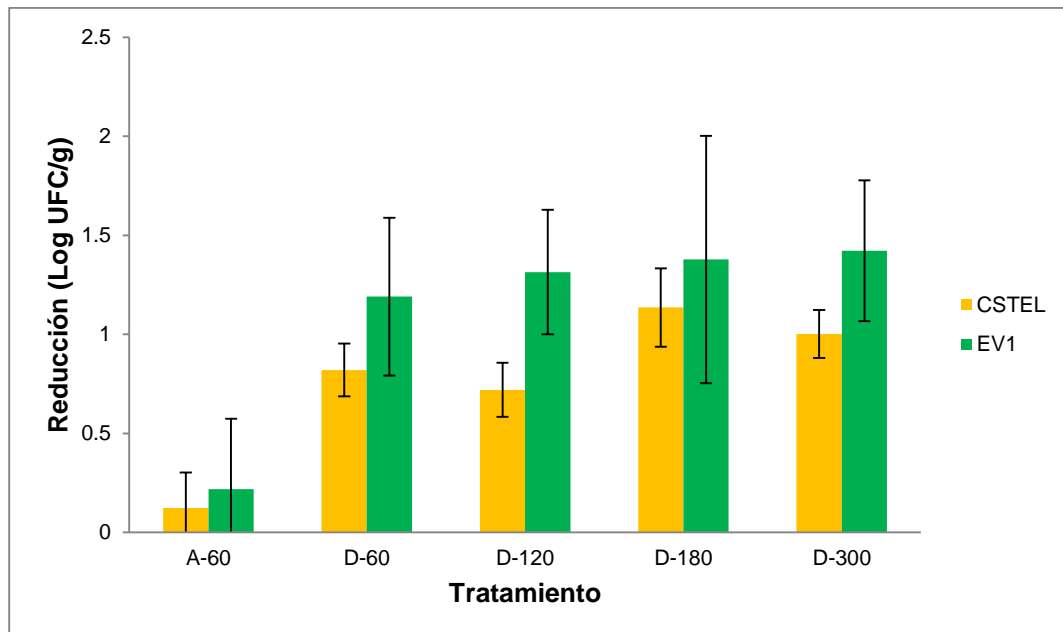


Figura 31. Reducción en la población de *L. monocytogenes* cultivada en CSTEL y EV¹ por efecto de la desinfección de coliflor cruda. A-60: agua desionizada durante 60 s (arrastre mecánico). D-60: 63 ppm de ácido peracético durante 60 s; D-120: 63 ppm de ácido peracético durante 120 s. D-180: 63 ppm de ácido peracético durante 180 s; D-300: 63 ppm de ácido peracético durante 300 s.

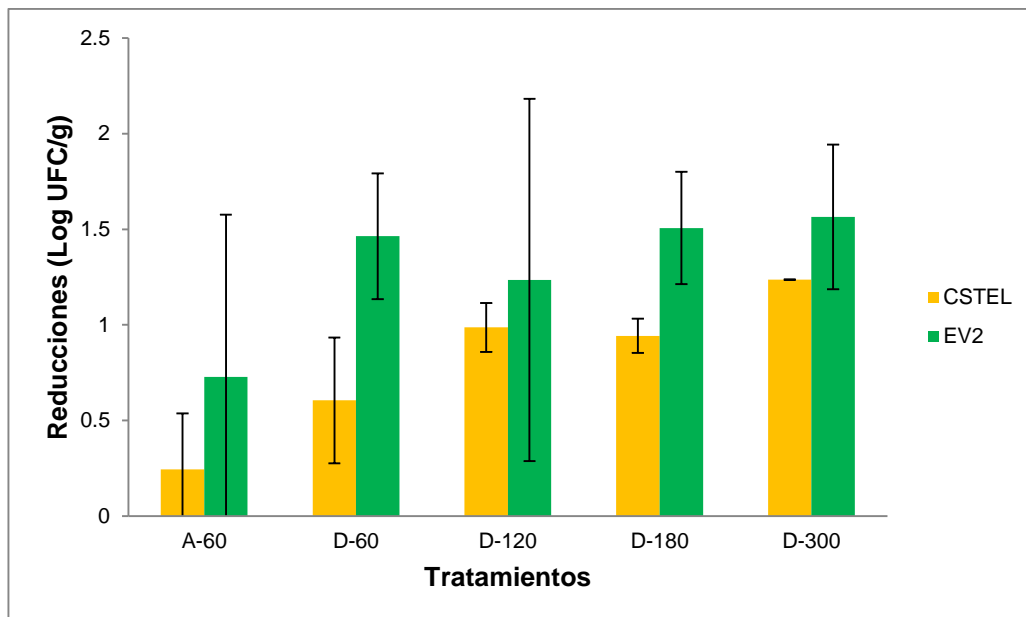


Figura 32. Reducción en la población de *L. monocytogenes* cultivada en CSTEL y EV¹ por efecto de la desinfección de zanahoria cruda. A-60: agua desionizada durante 60 s (arrastre mecánico). D-60: 63 ppm de ácido peracético durante 60 s; D-120: 63 ppm de ácido peracético durante 120 s. D-180: 63 ppm de ácido peracético durante 180 s; D-300: 63 ppm de ácido peracético durante 300 s.

El análisis de varianza confirmó que los factores tipo de tratamiento y sustrato en el que se incubaron las células de *L. monocytogenes* fueron significativos en los tres productos (Cuadro 16). En el caso de los tratamientos empleados se observó un efecto de la aplicación o no del desinfectante, pero no del tiempo de exposición. Mientras que con relación al tipo de sustrato en todos los casos cuando las células habían crecido previamente en el EV¹ el patógeno se inactivó con mayor facilidad. Esto pudo haberse debido a que aunque el patógeno tuvo una mejor adherencia con el producto, no se encontraba en su estado fisiológico óptimo al provenir de un medio con una menor calidad nutrimental respecto a CSTEL¹, y por lo tanto su viabilidad se ve más afectada cuando se aplica al aplicar el tratamiento desinfectante.

Cuadro 16. Análisis de varianza del efecto del tratamiento desinfectante y la historia previa de la célula en el crecimiento *L. monocytogenes*.

Producto	Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F Radio	Prob>F
Brócoli	Tratamiento	4	7.86	45.39	<0.0001*
	Historia previa de la célula	1	2.59	59.89	<0.0001*
	Tratamiento* Historia previa de la célula	4	1.90	10.95	<0.0001*
Coliflor	Tratamiento	4	8.38	17.57	<0.0001*
	Historia previa de la célula	1	1.36	11.47	0.0016*
	Tratamiento* Historia previa de la célula	4	0.34	0.71	0.6835
Zanahoria	Tratamiento	4	4.49	4.83	0.0036*
	Historia previa de la célula	1	2.31	9.96	0.0035*
	Tratamiento* Historia previa de la célula	4	0.51	0.54	0.7010

En el caso de brócoli se observó también un efecto significativo de la interacción del sustrato y el tratamiento (Figura 33), donde se ve claramente que la mezcla de cepas adaptadas a EV¹ tiene mayores reducciones en todos los tratamientos de desinfección respecto a las que se cultivaron en CSTE¹. Misma tendencia que no es observada en el control cuando solo es arrastre mecánico. Lo que nos confirma que el efecto de las reducciones no tiene que ver con la capacidad ni intensidad de adherencia sino con la viabilidad de la célula que pudo ser afectada al crecer en un medio obtenido de una mezcla de hortalizas. A pesar que para coliflor y zanahoria no existió un efecto significativo de esta interacción se observó una tendencia similar.

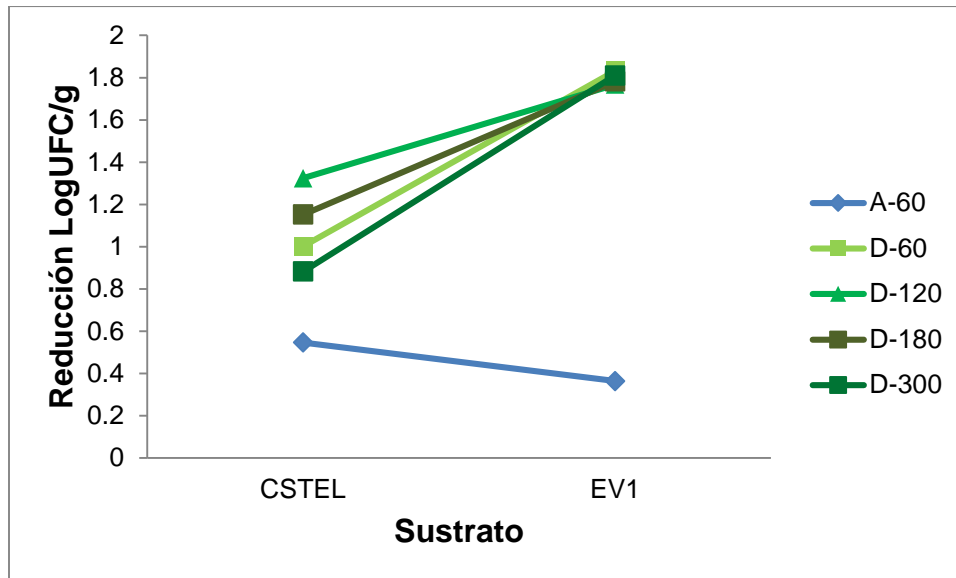


Figura 33. Efecto de la interacción entre los tratamientos de desinfección y el sustrato empleado previamente para el cultivo de las células sobre la reducción de *L. monocytogenes* en brócoli.

Al igual que con otros tratamientos, la resistencia de *L. monocytogenes* a tratamientos térmicos es influenciada por muchos factores como son la variación de las cepas, las condiciones de crecimiento previo, la exposición a un choque térmico, ácido o a otro estrés y la composición de la muestra que será tratada térmicamente (Doyle *et al.*, 2001). Lou y Yousef (1996) observaron que el estrés generado por una exposición a una baja concentración de nutrientes en el medio puede incrementar la resistencia térmica en este patógeno. También Mazzotta (2001) observó que había un incremento significativo en la resistencia térmica de este patógeno inoculado en setas después de ser sometidos a un estrés de inanición.

En la Figura 34 se observan las reducciones obtenidas del efecto del escaldado y del efecto combinado de desinfección y escaldado aplicados a brócoli, coliflor y zanahoria en la reducción de las poblaciones de *L. monocytogenes* previamente desarrolladas en un medio óptimo en nutrientes (CSTEEL) y en otro con baja concentración de nutrientes (EV¹). Estas reducciones son estadísticamente significativas respecto al control, pero no son diferentes cuando se comparan entre

las células adaptadas y no al sustrato. En brócoli y zanahoria el patógeno se inactivó por completo en los dos tipos de tratamiento aplicados (escaldado y desinfección/escaldado). En las muestras de coliflor a los 20 y 40 s de escaldado a 90°C, independientemente del medio de cultivo empleado la población de *L. monocytogenes* se redujo entre 2 y 3 Log UFC/g.

Debido a que en nuestro estudio en la mayoría de los casos no se tuvieron sobrevivientes bajo las condiciones de estudio empleadas, no se puede asegurar que la adaptación al sustrato no tenga un efecto sobre la resistencia térmica de este patógeno cuando se encuentra en brócoli, coliflor o zanahoria.

En los tres productos estudiados bajo las condiciones en las que se realizan estos procesos en la empresa no se obtuvieron células sobrevivientes lo que nos indica que sí existiera algún patógeno en el producto antes de escaldarse este pudiera ser eliminado sin problema si se realiza adecuadamente dicho proceso. En el tratamiento continuó de desinfección y escaldado, por ende tampoco se encontraron sobrevivientes.

Es importante mencionar que estos estudios a pesar que no fueron realizados con las cepas aisladas de la empresa de hortalizas congeladas nos dan un panorama acerca del comportamiento que el patógeno pudiera tener en la empresa. Sin embargo, sería necesario que se realizaran estudios empleando las cepas aisladas de la empresa para poder elucidar si su comportamiento ante dichos tratamientos es similar al observado con las cepas de referencia usadas en estas evaluaciones.

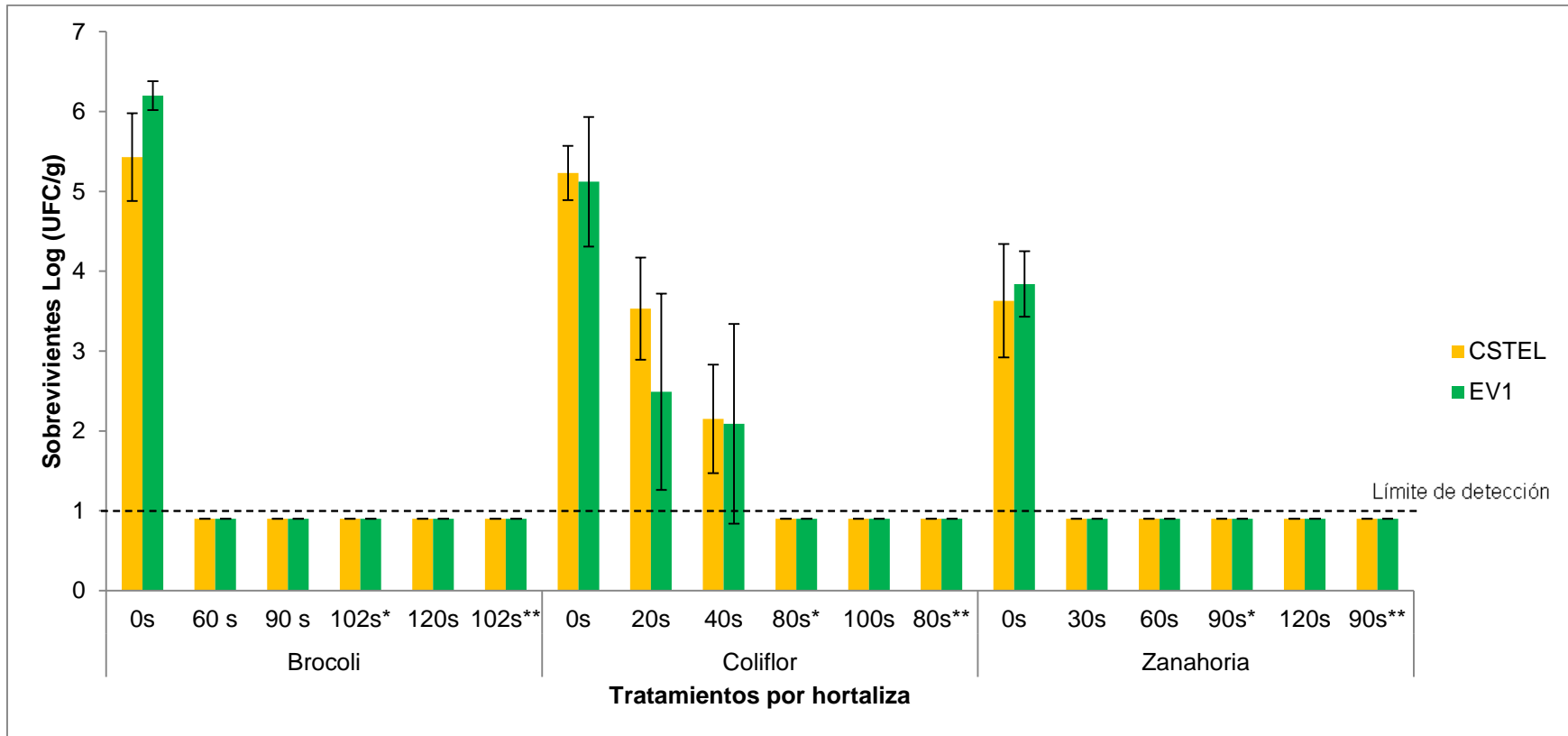


Figura 34. Efecto de la adaptación al sustrato sobre el escaldado y desinfección/escaldado de hortalizas frescas.

Limite de detección (<1 Log UFC/g) * Indica las condiciones en las cuales se realiza estos tratamiento en la empresa de hortalizas congeladas en cuestión. ** Indica el tratamiento realizado después de una desinfección durante 60 s en agua con 63 ppm de ácido peracético. a,b, Letras diferentes expresan una diferencia estadísticamente significativa entre los medios de cultivo a la misma temperatura Prueba t de Student ($P>0.05$). A,B Letras diferentes expresan una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos del mismo medio, Prueba Tukey($P>0.05$)

7 CONCLUSIONES

- En las líneas de empaquetado se encuentran los principales puntos de contaminación del producto *L. monocytogenes*.
- El pulsotipo B se encontró en el 63.96% de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la empresa y durante todos los muestreos realizados.
- *Listeria* spp. puede ser usado como un indicador confiable para predecir la presencia de *L. monocytogenes* en la planta procesadora de hortalizas congeladas tanto en muestras de producto como en superficies de contacto directo y no contacto.
- Las BMA pueden ser empleados como posibles microorganismos índices de *L. monocytogenes* en superficies de contacto directo dentro de la empresa de hortalizas congeladas, lo cual ayudará a detectar de manera más sencilla los posibles nichos de contaminación.
- Las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la empresa de hortalizas congeladas y la de referencia, tienen la capacidad de desarrollar en un EV que simula residuos de hortalizas en los equipos o superficies.
- Las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la empresa de hortalizas congeladas crecieron en el EV sólo y adicionado con ácido peracético.
- Las cepas de *L. monocytogenes* tolerantes a ácido peracético mostraron una mayor velocidad de desarrollo en todos los sustratos cuando se desarrollaron previamente en EV.
- Las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la empresa procesadora de hortalizas congeladas mostraron una mayor capacidad para formar biopelículas en el medio rico en nutrientes (CST) y en las condiciones óptimas (25°C/ 2 d) de almacenamiento.

- La formación de biopelículas por *L. monocytogenes* no tienen una relación directa con el desarrollo bacteriano.
- *L. monocytogenes* tiene mayor capacidad de adherirse a brócoli y coliflor cuando esta ha sido cultivada previamente en un medio con sustratos similares (EV) a los que se encuentran en estos dos productos.
- La efectividad del tratamiento de desinfección aplicado a brócoli, coliflor y zanahoria fue mayor sobre células de *L. monocytogenes* previamente cultivadas en EV¹.
- El desarrollo de *L. monocytogenes* en EV incrementa su susceptibilidad a ácido peracético en brócoli, coliflor y zanahoria.
- Los tratamientos de escaldado empleados en la empresa de hortalizas congeladas son efectivos ya que redujeron hasta el límite de detección (<10UFC/g) la concentración de *L. monocytogenes* presente en brócoli, coliflor y zanahoria.

8 BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Adzitey, F. and Huda, N. 2010. *Listeria monocytogenes* in foods: Incidences y possible control measures. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4(25): 2848-2855.
2. Ágoston, R. 2009. Understanding stress adaptive response in *Listeria monocytogenes*. Thesis Doctorate. Corvinus University of Budapest, Budapest. 128 p.
3. Aguado, V., Vitas, A.I. and García-Jalón, I. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA Typing Applied to the Study of Cross-Contamination by *Listeria monocytogenes* in Processed Food Products. *J. Food Prot.* 64 (5): 716–720.
4. Aguado, V., Vitas, A.I. and García-Jalón, I. 2004. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 341-347
5. Alali, W.Q and Schaffner, D.W. 2013. Relationship between *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. in Seafood Processing Plants. *J. Food Prot.* 76 (7): 1279-1282.
6. Babic, I., Nguyen-the, C., Amiot, M.J. and Aubert, S. 1994. Antimicrobial activity of shredded carrot extracts on food-borne bacteria and yeast. *J Appl Bacteriol.* 76(2):135-41.
7. Barbosa-Cánovas, G.V., Altunakar, B. and Mejía-Lorío, D.J. 2005. Freezing of fruits and vegetables: An agribusiness alternative for rural and semi-rural areas. *In FAO Agricultural Services Bulletin 158.* Rome.
8. Beuchat, L. R. and Brackett, R.E. 1990. Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (6): 1734- 1742.
9. Blackman, I.C. and J. F. Frank. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *J Food Prot.* 59: 827–831.

10. Borucki, M. K., J.D. Peppin, D. White, F. Loge, and D.R. Call. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7336-7342.
11. Burnett, S.L. and Beuchat, L.R. 2001. Food-borne pathogens: Human pathogens associated with raw produce y unpasteurized juices, y difficulties in decontamination. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27: 04–110.
12. CAE (Código Alimentario Español). Código Alimentario: Principios generales. 2011. Recuperado: <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/nutrihum/ResumenCodigoAlimentario.pdf>
13. Chang, V.P., Mills, E.W., and Cutter, C.N. 2003. Comparison of Recovery Methods for Freeze-Injured *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, y *Campylobacter coli* in Cell Suspensions y Associated with Pork Surfaces. *J. Food Prot.* 66 (5):798–803.
14. Collignon, S. and Korsten, S. 2010. Attachment and Colonization by *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium, and *Staphylococcus aureus* on Stone Fruit Surfaces and Survival through a Simulated Commercial Export Chain. *J. Food Prot.* 73(7): 1247–1256
15. Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. Caldwell, D. Korber, and H. Scott. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711–745.
16. Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. and Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:435-464.
17. Lundén, J., R. Tolvanen, and H. Korkeala. 2008. Acid and heat tolerance of persistent and non persistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 46:276–280.

18. Davey, M.E., and G. A. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:847-867.
19. Díaz, R.G. and Wachter, R.C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 45: 30-40.
20. Djordjevic, D., M. Wiedmann, and L. A. McLandsborough. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2950-2958.
21. Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang., T., Wiseman., D.W. and Scott, V. N. 2001. *J. Food Prot.* 64 (3):410–429
22. Dufrenne, J., Delfgou, E., Ritmeester, W., Notermans, S., 1997. The effect of previous growth conditions on the lag phase time of some foodborne pathogenic micro-organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 34: 89–94.
23. FAO. 2008. Buenas Prácticas Agrícolas. Obtenido el 20 de Agosto del 2014, de http://www.fao.org/prods/gap/index_es.htm
24. FAO/ COAG. 2003. Elaboración de un marco para las buenas prácticas agrícolas, Obtenido el 20 de Agosto del 2014, de <http://www.fao.org/docrep/MEETING/006/Y8704S.htm>
25. Farber, J.M. and Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiol. Rev.*55 (3): 476-511.
26. Fernández E.E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.
27. Ferreira, V., M. Wiedmann, P. Teixeira, and M.J. Stasiewicz. 2014. *Listeria monocytogenes* Persistence in Food Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *J. Food Prot.* 77:150-170,

28. FSAI (Food Safety Authority of Ireland). 2005. The Control and Management of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food. Ed. Microbiology. Dublin, Ireland, 94, p.
29. Folsom, J.P., G.R. Siragusa and J.F. Frank. 2006. Formation of Biofilm at different Nutrient Levels by Various Genotypes of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69(4): 826-834.
30. Frank, J. F., and R. A. Koffi. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53:550–554
31. Gyhi, M. and Chikindas, M.L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 1–15.
32. Heaton, J.C. and Jones, K. 2007. Microbial contamination of fruit y vegetables y the behavior of enteropathogens in the phyllosphere: A review. *J. Appl. Microbiol.* 104: 613–626.
33. Hill, C., Cotter, O.D., Sleator, R.D. and Gahan, C.G.M. 2002. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *Int. Dairy J.* 12: 273–283
34. Hoffman, A.D., Gall, K.I., Norton, D.M. and Wiedman, M. 2003. *Listeria monocytogenes* Contamination Patterns for the Smoked Fish Processing Environment and for Raw Fish. *J. Food Prot.* 66 (1): 52-60.
35. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Food). (2005). *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. 2nd edition. Kluwer Academic & Plenum Publishers. New York, USA.
36. Issa-Zacharia, A.; Kamitani, Y.; Muhimbula, H.S. and Ndabikunze. 2010. A review of microbiological safety of fruits y vegetables y the introduction of electrolyzed water as an alternative to sodium hypochlorite solution. *Afr. J. Food Sci.* 4(13): 778 – 789.

37. Jemmi, T and Stephan R. 2006. *Listeria monocytogenes* : Food-borne pathogen y hygiene indicator. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 25 (2): 571-580.
38. Jensen, A., Thomsen, L.W., Jorgensen, R.L., Larsen, M.H., Roldgay, B. B., Christensen, B.B, Vogel, B.F., Gram, L Ingmer, H. 2008. Processing plant persistent strains of *Listeria monocytogenes* appear to have a lower virulence potential than clinical strains in selected virulence models. *Int. J. Food Microbiol.*123: 254–261.
39. Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Margaret, S. P., Son, R., Farinazleen, M. G and Cheah, Y. K. 2010. Review Article. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int. Food Res. J.* 17: 1-11
40. Kataoka. A.I. 2011. Growth of *Listeria monocytogenes* in thawed frozen foods. Thesis Master of Science. Kansas State University. Kansas, USA. 93 p.
41. Knudsen, D.M., Yamamoto, S.A. and Harris, K.J. 2001. Survival of *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 on Fresh y Frozen Strawberries. *J. Food Prot.* 64 (10): 1483–1488.
42. Koutsoumate, K.P., Kyall, P.A. and Sofos J.N. 2003. Effect of Food Processing-Related Stresses on Acid Tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*69: 7514–7516.
43. Kumar, C. G. and S. K. Anand. 1998. Significance of microbial biofilms in the food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42: 9–27.
44. Lamikanra, O. 2002. Fresh-Cut Fruits y Vegetables: Science, Technology, y Market. CRC Press LCC. USA.
45. Lianou, A. and Sofos, J.N. 2007. Review of the Incidence y Transmission of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Products in Retail y Food Service Environments. *J. Food Prot.* 70 (9): 2172–2198

46. López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J. y Marínez-Suárez, J.V. 2006. *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Rev. Argent. Microbiol.* 38: 224-234.
47. Lou, Y. and Yousef, a.E. 1996. Resistance of *Listeria monocytogenes* to Heat after Adaptation to Environmental Stresses. *J. Food Prot.* 59(5): 465-471.
48. Lou, Y. and Yousef, a.E. 1997. Adaptation to Sublethal Environmental Stresses Protects *Listeria monocytogenes* against Lethal Preservation Factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (4): 1252–1255.
49. Loura, C.C., Almeida, C.C.R., Almeida, P.F. 2007. The incidence y level of *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* contamination in processed poultry at a poultry processing plant. *J. Food Saf.* 25: 19-29.
50. Lui, D. 2006. Identification, subtyping y virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J. Med. Microbiol.* 55: 645–659.
51. Lui, D. Jeral, A.A., Austin, F.W. and Lawrence, M.L. 2003. Characterization of virulent y avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator y internalin genes. *J. Med. Microbiol.* 52: 1065–1070.
52. Lui, D. Jeral, A.A., Austin, F.W. y Lawrence, M.L. 2003. Characterization of virulent y avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator y internalin genes. *J. Med. Microbiol.* 52: 1065–1070.
53. Lukinmaa, S., Miettinen, M., Nakari, U., korkeaa, H. and Siitonen, A. 2003. *Listeria monocytogenes* Isolates from Invasive Infections: Variation of Sero- y Genotypes during an 11-Year Period in Finly. *J. Clin. Microbiol.* 41 (4): 1694.1700.

54. Lundén, J., Autio, t., Markkula, A., Hellström, S. and Korkeala, H. 2003. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent y non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 265– 272.
55. Lunde'n, J., R. Tolvanen, and H. Korkeala. 2008. Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 46:276–280.
56. Lynn, R.B. 2004. The control, survival, y growth of *Listeria monocytogenes* on food products. Thesis Doctorate. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. Louisiana, USA. 126 p.
57. Manani, T.A., Collison, E.K. and Mpuchae S. 2006. Microflora of Minimally Processed Frozen Vegetables Sold in Gaborone, Botswana. *J. Food Prot.* 69(11): 2581–2586
58. Marco, R.N. 2012. *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos LPC. Resistencia a los antibióticos. Tesis de Maestría. Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España.
59. Matthyse, A.G. 1992. Adhesion Bacterial. Lederberg, J. *In: Encyclopedia of microbiology.* 2nd edition. Academic Press, Inc .Vol. 1. USA: 42-52 p.
60. Mazzotta, A.S. 2001. Heat Resistance of *Listeria monocytogenes* in Vegetables evaluatin of Blanching Process. *J. Food Prot.* 64 (3): 385-387.
61. McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J. and Jewell, K. 2004. *Listeria monocytogenes* y listeriosis: A review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 15-33.
62. Medrano, M.V., Restrepo, S. and Vanegas, M.C. 2006. Tipificación molecular de *Listeria monocytogenes* aisladas de muestras clínicas y alimentos. *Biomédica.* 26: 442-450.

63. Nilsson, R.E., T. Ross and J. P. Bowman. 2011. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 150_ 14-24.
64. Muriel, B.I. 2011. Detection and molecular subtyping of *Listeria monocytogenes* isolated from a South African avocado processing facility. Thesis Master of Science in Food Science. Stellenbosch University. Stellenbosch, South Africa.
65. NAS (National Academy of Sciences). 1975. Prevention of Microbial y Parasitic Hazards Associated with Processed Foods. USA.
66. O'Grady, J., Ruttledge, M., Sedano-Balbás, S., Smith, T.J., Barry, T. and Manherm M. 2009. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR. *Food Microbiol.* 26: 4–7.
67. Olesen, I., Vogense, F.K. and Jespersen, L. 2009. Gene Transcription and Virulence Potential of *Listeria monocytogenes* Strains After Exposure to Acidic y NaCl Stress. *Foodborne Pathog. Dis.* 6(6): 669- 680.
68. O'Toole, A.G. 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp.* 10.3791/2437
69. Paciorek, J., Jacquet, C., Salcedo, C., Doumith, M., Vázquez, J.A., and Martin, P. 2006. Genotypes of *Listeria monocytogenes* Strain isolated from 2000 to 2002 in Poly. *Pol. J. Microbiol.* 55: 31-35.
70. Palma-Quiroz, I. A., Gómez-Aldapa, C. A., Torres-Vitela., M. R., Rangel-Vargas, E., Santos-López, E.M., Villarruel-López, A., Castro-Rosas, J. 2013. The behavior of *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Agona and *Salmonella* Montevideo in raw carrot and in fresh unpasteurized carrot juice. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7 (20): 2365-2371.
71. Pan, Y., F. Breidt Jr., and S. Kathariou. 2009. Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 5846–5852.

72. Patel, J.R.; Sharma, M. and Ravishakar, S. 2011. Effect of curli expression and hydrophobicity of *Escherichia coli* O157:H7 on attachment to fresh produce surfaces. *J. Appl Microbiol.* 110: 737–745
73. Pappelbaum, K., Grif, K., Heller, I., Würzner, R., Hein, I., Ellerbroek, L. and Wagner, M. 2008. Monitoring Hygiene On- and At-Line Is Critical for Controlling *Listeria monocytogenes* during Produce Processing. *J. Food Prot.* 71(4): 755-741.
74. Peralta, M.A.K. Caracterización bioquímica, molecular y determinación de virulencia de cepas de *Listeria monocytogenes* en productos agropecuarios Chilenos. Tesis Maestría. Universidad Politécnica de Valencia, España
75. Pouch, D. F., Ito, K. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of food. American Public Health Association. 4^a Edition . USA. 676 p.
76. PulseNet. 2013. “Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes*”. (CDC). Centers for Disease Control and Prevention. PNL04.
77. Rocha, G.R.C.; Lozano, Z.P. y Martínez, L.Y. 2004. Mecanismo de patogenicidad e interacción parásito-hospedero. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. 325 p.
78. Robinson, T. P.; Ocio, M.,J.; Kaloti, A. and Mackey, M. 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 83–92.
79. Sánchez, V.R.H. 2008. Introducción a la trazabilidad: Un primer acercamiento para su comprensión e implementación. El Escriba. Buenos Aires, Argentina.
80. Saper, G.M. 2001. Efficacy of Washing and Sanitizing Methods for Disinfection of Fresh Fruit and Vegetable Products. *Food Technol. iotechnol.* 39 (4): 305–311

81. Saper, G.M, Gorny, J.R. and Yousef, A.E. 2006. Microbiology of Fruit and Vegetables. Taylor & Francis. New York, EUA.
82. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2013. Hortalizas, legumbres y frutos en las exportaciones mexicanas. México. Recuperado: <http://www.campomexicano.gob.mx/boletinsiap/018-e.html>
83. Singer, R., Sisco, W. and Carpenter, T. 2004. Exploration of biases that affect the interpretation of restriction fragment produced by pulse-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5502- 5511.
84. Sinha, N., Sindhu, J., Barta, J., Wu, J., and Pilar, C.M. 2012. Handbook of Fruits and Fruit Processing. 2nd edition. Wiley-Blackwell. 712 p.
85. Soni, K.A., Nannapaneni, R., y Tasara, T. 2011. The contribution of transcriptomic and proteomic analysis in elucidating stress adaptation responses of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* 8(8): 843-852.
86. Tasara, T. and Stephan, R. 2006. Cold Stress Tolerance of *Listeria monocytogenes*: A Review of Molecular Adaptive Mechanisms y Food Safety Implications. *J. Food Prot.* 69(6): 1473–1484
87. Thévenot, D. , Dernburg, A., and Vernozy-Rozad, C. 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry y its products. *J. Appl Microbiol.* 101(1):7-17.
88. Torreggiani, D., Lucas, T. and Raoult-Wack A. 2000. Chapter 4: The pre-treatment of fruits y vegetables. Kennedy J. C. *In Managing frozen foods*. CRC. USA.
89. Torres, K., Sierra, S. Poutou, R., Carrascal, A. Mercado, y M. 2005. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, Microorganismos Zoonotico Emergente. *Revista MVZ Córdoba.* 10 (1): 511-543.

90. Tunick, M. H., Novak, J. S., Bayles, D. O., Lee, J. and Kaletuc. 2009. Chapter 7. Analysis of Foodborne Bacteria by Differential Scanning Calorimetry. Gönül Kaletunç. *In* Calorimetry in Food Processing: Analysis and Design of Food System. Wiley-Blackwell. USA.
91. USDA-FSIS. (United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science). 2013. Microbiology Laboratory Guidebook. Disponible en la página: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/fsis-content/internet/main/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook/microbiology-laboratory-guidebook>. Fecha de acceso junio 2013.
- 92.
93. Wu, V.C.H. 2008. A review of microbial injury y recovery methods in food. *Food Microbiol.* 25: 735–744.
94. Yousef, A.E., and Juneja V.K. 2003. Microbial Stress Adaptation y Food Safety. CRC Press LLC. USA.

9 ANEXOS

Anexo 1. Protocolo del kit de extracción de ADN (DNeasy Tissue and Blood kit)

A partir de un cultivo puro incubado previamente 19h a 35 °C, se colocó 1 mL en tubos eppendorf y se centrifugó a 8000 rpm durante 8 min. Posteriormente se adicionaron 200 µL de buffer ASL, mezclando a máxima velocidad hasta disolver y se incubó a 95°C por 10 min. Seguido de esto se adicionaron 25 µL de proteinasa K y 200 µL de buffer AL, se mezcló y se incubó durante 15 min a 56°C. Después se adicionaron 200 µL de etanol absoluto y se vació la suspensión en las columnas del kit, y fue centrifugando a 8000 rpm durante 1 min. Se pasó la columna a otro tubo y se añadieron 500 µL de buffer AW1 y se repitió la centrifugación bajo las condiciones anteriores. Seguido se realizó un segundo lavado con 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó a 13500 rpm durante 3 min, se vertió el líquido y se volvió a centrifugar por un min bajo las mismas condiciones para eliminar cualquier residuo que aña quedado dentro de la columna. Por último se colocó la columna dentro de un tubo eppendorf y se le adicionaron 200 µL de buffer AE, se dejó incubar 3 min a temperatura ambiente y se centrifugo durante 2 min a 11000 rpm. El ADN obtenido se guardó a -20 °C.

Anexo 2. Optimización y estandarización del protocolo de PCR para la identificación del gen *hly* mediante los primers LM1 y LM2

Los primers LM1 y LM2 son uno de los más usados hoy en día para la detección de este gen (Aznar and Alarcón, 2002; Aznar and Alarcón, 2003; Lakicevic *et al*, 2010; Atil *et al*, 2011; Ozbey *et al*, 2013). Sin embargo, se ha reportado la aparición de otras bandas inespecíficas (Aznar y Alarcón, 2002) tanto para especies diferentes a *L. monocytogenes* como para este patógeno. Por lo cual fue necesaria la optimización de dicho protocolo para evitar la aparición de bandas diferentes a la específica que puedan poner en juego la confirmación de *L. monocytogenes*. Figura 1A muestra el gel de electroforesis con las condiciones establecidas por Aznar y Alarcón (2002). Figura 1B muestra el gel de electroforesis empleando el protocolo optimizado.

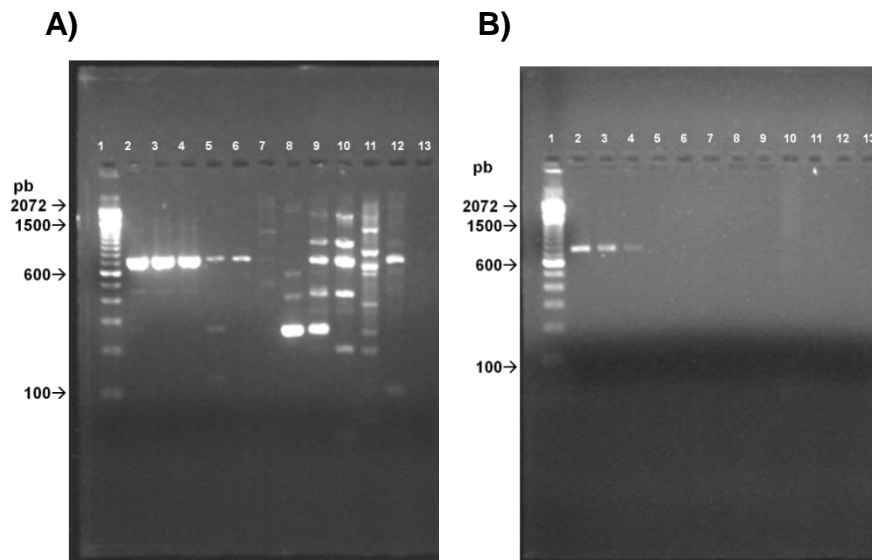


Figura 1A. Identificación de *L. monocytogenes* usando el protocolo de PCR establecido por Aznar y Alarcón (A) y el nuevo protocolo estandarizado (B).

Pozo1 Marcador de peso molecular; pozo 2, *L. monocytogenes* Scott A; pozo 3, *L. monocytogenes* CDC; pozo 4, *L. monocytogenes* ATCC 19115; pozo, *L. seeligeri*; pozo 6, *L. innocua* ATCC 33090; pozo 7, *L. innocua*; pozo 8, *E. coli* ATCC H10410; pozo 9, S. Thompson ATCC 8391; pozo 10,) *Salmonella* spp. (Silliker); pozo 11, chile inoculado; pozo 12, jitomate inoculado; pozo 13, control negativo

Anexo 3. Procedimiento para la tipificación por electroforesis por campo eléctrico pulsado (PulseNet, 2013)

Reactivos

- Buffer TE (Tris: EDTA Buffer, pH 8.0 (TE, 10 mM Tris:1mM EDTA, pH 8.0)
- Buffer de lisis celular (50mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% N-Lauroylsarcosine + 0.1 m/mL Proteinasa K)
- Lisozima (20 mg/mL) en buffer TE
- Proteinasa K (20 mg/mL) en agua para laboratorio clínica estéril o solución comercial
- Buffer TBE 0.5 X

Día 0

Estriar cada patógeno en AST, e incubar a 37°C por 14-18 h.

Día 1

A partir del cultivo puro, ajustar una suspensión bacteriana con buffer TE a una densidad óptica de 1.0 a 600 nm. De la suspensión ajustada se toman 200 µL en un tubo eppendorf (1.5 mL) y se le adicionan 20 µL de una solución stock de lisozima (20 mg/mL), y se incuban de 10 a 20 min en un baño estacionario entre 55-60°C. Posteriormente se le adicionan 20 µL de una solución stock de proteinasa K, la cual se mezcla ligeramente con la pipeta. Después se le adicionan 400 µL de agarosa Seakem Gold, mezclando ligeramente y de manera inmediata se dispensa la mezcla en los moldes para cubos, dejando solidificar a temperatura ambiente de 10 a 15 min.

Los cubos (2 a 4 de la misma cepa) se colocan en tubos Falcons de 50 mL con 5 mL de buffer de lisis. Incubando los tubos de 54 a 55 °C en un baño con agitación (150-175 rpm) durante 2h. Transcurrido el tiempo se decanta el buffer y se lavan los cubos con 10-15 mL de agua ultra pura previamente calentada de 54 a 55°C. Se realizan dos lavados con agua ultra pura y tres con buffer TE.

Finalizando los lavado se corta una tira del cubo de aproximadamente 2 a 2.5 mm y se coloca en un tubo eppendorf (1.5 mL). De acuerdo a la enzima de restricción que se empleara se diluye el buffer de restricción 10X a 1X y se adicionan 200 μ L y se incuban de 10 a 15 min a la temperatura óptima de la enzima de restricción que se empelara. Posteriormente se adicionan 200 μ L de la mezcla de la enzima de restricción, para el caso de las muestras de *L. monocytogenes* se emplea Apal y Xba1 para *Salmonela* ser. Branderup H9812 (Cuadro 2a y 3a) y se incuban durante 2 h en un baño a su temperatura óptima (etiqueta de la enzima de restricción)

Cuadro 2a. Mezcla de Apal

Reactivo	μL/pieza de cubo	μL/ 10 piezas de cubo
Agua para reactivos de laboratorio clínico estéril	175.5 μ L	1755 μ L
10X Buffer de restricción	20 μ L	200 μ L
BSA (10 mg/mL)	2 μ L	20 μ L
Apal (10 U/ μL)	2.5 μ L	25 μ L
Total	200 μ L	2000 μ L

Cuadro 3a. Mezcla de Xba1

Reactivo	μL/pieza de cubo	μL/ 10 piezas de cubo
Agua para reactivos de laboratorio clínico estéril	173 μ L	1730 μ L
10X Buffer de restricción	20 μ L	200 μ L
BSA (10 mg/mL)	2 μ L	20 μ L
Apal (10 U/ μL)	5 μ L	50 μ L
Total	200 μ L	2000 μ L

Se retiran las piezas del cubo del tubo y se colocan en el peine de la cámara donde se formara el gel de electroforesis. En los dientes del peine 1, 5, 10 y 15 (15 pozos), en los demás dientes del peine, se coloca las muestras. Se ponen a secar al aire de 10 a 15 min. El peine se coloca dentro de la cámara de electroforesis y se le añade 1% de agarosa LF™ (150 mL) atemperada de 55-60°C. Se deja solidificar a temperatura ambiente.

Al equipo de electroforesis por campo pulsado se le adicionan 2.2 de buffer TBE 0.5 X. El aparato se calibra para que la bomba que tenga un flujo de 1L/min (~70) y el modulo de enfriamiento una temperatura de 14°C.

Se coloca el gel en el equipo y se programa a las siguientes condiciones: a) Pulso inicial 4.0s, pulso final 40.0 s, voltaje 6V y tiempo 19.2h.

Día 2

Transcurrido el tiempo de electroforesis se saca el gel y se coloca a teñir dentro de un recipiente con una solución de bromuro de etidio (0.001mg/mL) de 20 a 30 min. Posteriormente se destiñe el gel colocando de 60 a 90 min en agua para laboratorio clínico estéril, con cambios de agua cada 20 min. Por último se toma la foto del gel en el fotodocumentador.

Anexo 4. Valoración del ácido peracético (UAQ) (Greenspan y Mackellar, 1948).

- Determinación del peróxido de hidrógeno

Adicionar 10 ml de muestra en un matraz Erlenmeyer con 50 ml de ácido sulfúrico 1 N. Agregar dos gotas de indicador de ferroína y mezclar. Titular con tiosulfato cérico 0.1 N hasta que persista la desaparición del color naranja por un minuto. Registrar la lectura como punto de equivalencia.

- Determinación del ácido peracético

Después de alcanzar el punto de equivalencia mencionado anteriormente, agregar 10 ml de solución 2 N de yoduro de potasio y 2 ml de la solución indicadora de almidón (solución 1 %), agitar. Titular rápidamente con solución valorada de tiosulfato de sodio 0.1 N hasta que el color naranja original aparezca. Registrar los mililitros de tiosulfato gastados al punto de equivalencia.

$$\%H_2O_2 = \frac{V1 * N1 * meqH_2O_2 * F1 * 100}{m}$$

Cálculos:

V1 = Volumen de sulfato cérico consumido en la titulación del H₂O₂ (ml).

N1 = Normalidad del sulfato cérico.

meq H₂O₂ = PM H₂O₂ / no. e⁻ cargados en la reacción redox = 0.017.

F1 = Factor de dilución

m= muestra

Anexo 5. Reducción en la concentración de *L. monocytogenes* durante un minuto de contacto en buffer de fosfatos con 50 ppm de ácido peracético

No. muestra	Ácido peracético		Reducción Log(UFC/mL)
	0 ppm Log(UFC/mL)	50 ppm Log(UFC/mL)	
2	9.07	5.75	3.32
3	9.41	6.13	3.27
	9.06	6.27	2.80
	9.26	6.05	3.21
6	7.94	5.26	2.68
	9.10	5.85	3.25
	8.86	4.80	4.06
7	8.80	3.72	5.08
8	9.07	6.16	2.91
	9.07	5.75	3.32
12	8.92	4.32	4.60
28	8.75	4.45	4.30
42	9.01	4.28	4.73
56	8.79	5.54	3.25
60	8.22	3.96	4.26
66	7.94	5.54	2.40
83	9.00	4.68	4.32
86	8.98	4.96	4.02
88	8.60	3.74	4.86
89	8.74	5.96	2.78
93	8.55	6.14	2.40
102	8.30	5.22	3.07
105	8.55	5.24	3.31
124	8.80	6.51	2.29
140	8.50	3.38	5.12
142	8.55	3.20	5.35
152	8.52	4.70	3.82
181	8.57	3.40	5.17
198	8.52	5.84	2.67
199	8.55	5.29	3.26
200	8.12	4.18	3.94
201	8.16	4.36	3.79
202	8.30	4.61	3.69

372	9.00	5.91	3.10
	8.55	5.75	2.79
389	8.69	4.93	3.77
	8.12	6.14	1.98
409	7.82	5.57	2.25
	8.09	5.22	2.87
469	8.72	6.93	1.80
472	8.80	6.17	2.63
473	9.03	5.30	3.73
	9.17	5.18	3.99
	8.97	5.61	3.36
475	8.63	5.54	3.10
	8.72	3.52	5.20
	9.01	5.18	3.83
483	8.77	5.40	3.37
490	9.13	6.39	2.74
522	9.05	5.15	3.90
	9.17	6.57	2.59
537	8.99	4.55	4.44
	8.68	4.62	4.06
	8.96	4.62	4.33
538	8.83	5.16	3.68
	9.25	5.17	4.09
	9.41	5.34	4.06
540	8.96	6.33	2.62
	8.64	5.84	2.80
	8.56	5.78	2.78
541	8.82	4.34	4.48
	8.66	4.87	3.79
568	9.02	5.37	3.66
	8.82	5.65	3.17
	8.98	5.33	3.65
570	9.12	5.38	3.73
	8.99	4.94	4.05
	8.97	4.99	3.97
572	8.91	6.33	2.58
	8.85	6.85	2.00
	8.65	5.52	3.13
574	8.64	5.04	3.60
	8.63	4.83	3.80
	8.55	5.88	2.67

Anexo 6. Valoración del ácido peracético (IRTA)

Añadir 20 mL de ácido sulfúrico (25%) a 50 mL de solución a testar. Añadir permanganato potásico (0.1 N), hasta color rosa permanente. Luego añadir 5 mL de solución de ioduro potásico (10 %) y 2 mL de indicador de almidón (1%) y valorar con tiosulfato sódico (0.1 N) hasta la desaparición del color.

ppm ácido peracético (PAA) = valoración (mL)x76

Anexo 7: Desglose de las pruebas bioquímicas y PCR realizado a las cepas presuntamente identificadas como *L. monocytogenes*.

No. muestra	Zona	Fecha	Descripción	Pruebas confirmatorias					
				Ramnosa	Xilosa	Manitol	Movilidad	PCR (hly)	
1	Hayssen 1	4 de septiembre del 2012	Coliflor	Producto terminado y empaquetado	+	-	-	+	-
					+	-	-	+	-
2	Hayssen 1	4 de septiembre del 2012	Coliflor	Producto terminado y empaquetado	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	-
3	Hayssen 1	4 de septiembre del 2012	Coliflor	Producto terminado y empaquetado	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
6	Hayssen 1	4 de septiembre del 2012	Champiñón	Producto terminado y empaquetado	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+

7	Hayssen 1	4 de septiembre del 2012	Champiñón	Producto terminado y empaquetado	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	-
8	Hayssen 1	4 de septiembre del 2012	Champiñón	Producto terminado y empaquetado	+	-	-	+	-
					+	-	-	+	+
10	Hayssen 1	4 de septiembre del 2012	Champiñón	Producto terminado y empaquetado	+	-	-	+	-
					+	-	-	+	-
					+	-	-	+	-
12	Hayssen 1	4 de septiembre del 2012	Superficie de no contacto	Drenaje debajo de Volt Hal	+	-	-	+	+
28 ^a	Lavado y desinfección	20 de septiembre del 2012	Superficie de contacto directo	Agua	NR	NR	NR	+	+
33 ^a	Hayssen 1	20 de septiembre del 2012	Chicharo	Dosificador	NR	NR	NR	+	+
42	Hayssen 3	20 de septiembre del 2012	Mezcla de verduras	Caída del toten ante del vibrador	+	-	-	+	+
56	Hayssen 3	20 de septiembre del 2012	Superficie de contacto directo	Final del elevador y antes del dosificador	+	-	-	+	+

60	Hayssen 3	20 de septiembre del 2012	Superficie de contacto directo	Dosificador	+	-	-	+	+
61 ^a	Hayssen 3	20 de septiembre del 2012	Superficie de contacto directo	Dosificador	NR	NR	NR	+	+
66	Hayssen 1	20 de septiembre del 2012	Superficie de contacto directo	Toten	+	-	-	+	+
76 ^a	Hayssen 1	20 de septiembre del 2012	Superficie de contacto directo	Inicio del elevador	NR	NR	NR	+	+
83	Hayssen 3	20 de septiembre del 2012	Superficie de contacto directo	Inicio del elevador	+	-	-	+	+
86	Hayssen 1	20 de septiembre del 2012	Superficie de contacto directo	Cono	+	-	-	+	+
88	Hayssen 1	20 de septiembre del 2012	Superficie de contacto directo	Cono	+	-	-	+	+
89	Hayssen 3	20 de septiembre del 2012	Superficie de contacto directo	Cono	+	-	-	+	+
93	Hayssen 1	20 de septiembre del 2012	Superficie de no contacto	Coladera	+	-	-	+	+

95 ^a	Hayssen 3	20 de septiembre del 2012	Superficie de contacto directo	Final del elevador y antes del dosificador	NR	NR	NR	+	NR
102	Hayssen 1	20 de septiembre del 2012	Superficie de no contacto	Piso	+	-	-	+	+
105	Hayssen 1	20 de septiembre del 2012	Superficie de no contacto	Suela de zapatos de trabajo (Marcela Alarcón)	+	-	+	+	NR
124	Lavado y desinfección	20 de septiembre del 2012	Superficie de no contacto	Superficie de patines de montacargas	+	-	-	+	+
137	Hayssen 1	31 de octubre del 2012	Superficie de contacto directo	Dosificador	+	-	-	+	-
140	Hayssen 1	31 de octubre del 2012	Superficie de contacto directo	Cono	+	-	-	+	+
142	Hayssen 1	31 de octubre del 2012	Superficie de contacto directo	Cono	+	-	-	+	+
152	Hayssen 1	31 de octubre del 2012	Superficie de contacto directo	Final del elevador y antes del dosificador	+	-	-	+	+
181	Hayssen 1	31 de octubre del 2012	Chícharo	Toten	+	-	-	+	-

198	Hayssen 1	2 de mayo del 2013	Champiñón	Producto terminado y empaquetado	+	-	-	+	+
199	Hayssen 1	2 de mayo del 2013	Champiñón	Producto terminado y empaquetado	+	-	-	+	+
200	Hayssen 1	6 de mayo del 2013	Champiñón	Producto terminado y empaquetado	+	-	-	+	+
201	Hayssen 1	18 de julio del 2013	Espinaca	Producto terminado y empaquetado	+	-	-	+	+
202	Corte	17 de julio del 2013	Chile	Materia prima	+	-	-	+	+
206	Hayssen 3	30 de julio del 2013	Superficie de contacto directo	Caída del toten antes del vibrador	-	+	-	+	NR
					-	+	+	+	NR
					+	-	-	+	-
208	Hayssen 3	30 de julio del 2013	Superficie de contacto directo	Caída del toten antes del vibrador	-	-	-	+	NR
					-	-	-	+	NR
212 ^a	Hayssen 3	30 de julio del 2013	Superficie de contacto directo	Inicio del elevador	-	+	+	+	NR

214	Hayssen 3	30 de julio del 2013	Superficie de contacto directo	Inicio del elevador	-	+	-	+	NR
216	Hayssen 3	30 de julio del 2013	Superficie de contacto directo	Final del elevador y antes del dosificador	-	+	+	+	NR
					-	-	+	+	NR
217	Hayssen 3	30 de julio del 2013	Superficie de contacto directo	Final del elevador y antes del dosificador	-	+	-	+	NR
					-	+	-	+	NR
219	Hayssen 3	30 de julio del 2013	Superficie de contacto directo	Dosificador	-	+	-	+	NR
240	Hayssen 3	30 de julio del 2013	Mezcla de vegetales	Producto terminado y empaquetado	-	+	-	+	NR
					+	+	-	+	NR
					+	+	-	+	NR
241	Hayssen 3	30 de julio del 2013	Mezcla de vegetales	Producto terminado y empaquetado	-	-	+	+	NR
					-	-	+	+	NR
336	Hayssen 3	03 de septiembre del 2013	Superficie de contacto directo	Dosificador	-	-	-	+	NR
					-	+	+	+	NR
343	Hayssen 3		Brócoli	Vibrador	-	+	+	+	NR

		03 de septiembre del 2013			+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
372	Corte	03 de septiembre del 2013	Brócoli	Materia prima	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
					-	+	-	+	NR
389	Hayssen 3	03 de septiembre del 2013	Superficie de no contacto	Coladera	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
409	Hayssen 1	24 de septiembre del 2013	Superficie de contacto directo	Inicio del elevador	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
469	Hayssen 1	24 de septiembre del 2013	Superficie de no contacto	Coladera	+	-	-	+	+
472	Hayssen 3	24 de septiembre del 2013	Superficie de no contacto	Piso	+	-	-	+	+
473	Hayssen 3	24 de septiembre del 2013	Superficie de no contacto	Coladera	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+

475	Hayssen 3	24 de septiembre del 2013	Superficie de no contacto	Pala para recoger producto del piso	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
483	Corte	3 de septiembre del 2013	Chile	Materia prima	+	-	-	+	+
484	Hayssen 1	24 de septiembre del 2013	Champiñón	Producto terminado y empaquetado	-	-	-	+	NR
486	Hayssen 1	7 de octubre del 2013	Champiñón	Producto terminado y empaquetado	+	-	-	+	-
					+	-	-	+	-
487	Hayssen 1		Chícharo	Producto terminado y empaquetado	-	+	+	+	NR
					-	+	+	+	NR
490	Corte	7 de noviembre del 2013	Elote		+	-	-	+	+
522	Lavado y desinfección	06 de diciembre del 2013	Superficie de no contacto	Superficie de patines de montacargas	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
524	Lavado y desinfección	06 de diciembre del 2013	Superficie de no contacto	Coladera	-	-	-	+	NR
					-	-	-	+	NR

					-	-	-	+	NR
537	Escaldado e IQF	06 de diciembre del 2013	Superficie de no contacto	Coladera	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
538	Escaldado e IQF	06 de diciembre del 2013	Superficie de no contacto	Coladera	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
540	Hayssen 1	06 de diciembre del 2013	Superficie de no contacto	Piso	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
541	Hayssen 1	06 de diciembre del 2013	Superficie de no contacto	Piso	+	-	-	+	+
					-	-	-	+	NR
					+	-	-	+	+
568	Hayssen 3	06 de diciembre del 2013	Superficie de no contacto	Coladera	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+

					+	-	-	+	+
570	Hayssen 3	06 de diciembre del 2013	Superficie de no contacto	Pala para recoger producto del piso	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
572	Hayssen 3	06 de diciembre del 2013	Superficie de no contacto	Piso	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
					+	-	-	+	-
574	Hayssen 3	06 de diciembre del 2013	Superficie de contacto directo	Toten	+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+
					+	-	-	+	+

^aCepas que no se lograron recuperar para estudios posteriores.NR: No realizado.

Anexo 8. Abreviaturas

Cuadro 4a. Abreviatura de revistas científicas

Int. J. Food Microbiol	International Journal of Food Microbiology
J. Food Prot.	Journal of Food Protection
J. Gen. Appl. Microbiol.	Journal of General and Applied Microbiology
J. Med. Microbiol.	Journal of Medical Microbiology
J. Microbiol. Methods	Journal of Microbiological Methods
J. Microbiol.	Journal of Microbiology
J. Microbiol. Biotechnol.	Journal of Microbiology and Biotechnology.
Lett. Appl. Microbiol.	Letters in Applied Microbiology

Cuadro 5a. Abreviaturas generales

h	Hora
µL	Microlitros
°C	Grado centígrado
mg	Miligramo
mL	Mililitro
Log	Logaritmo base 10
cm ²	Centímetro cuadrado
nm	Nanómetro
UFC	Unidades formadoras de colonias
CST	Caldo soya tripticasa
CSTEL	Caldo soya tripticasa con extracto de levadura
AST	Agar soya tripticasa
ABRV	Agar bilis rojo violeta
MRS	Agar de Man-Rogosa Sharp
EV	Extracto vegetal
PPA	Ácido peracético