



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**“CONTAMINACION, SOBREVIVENCIA Y DESARROLLO DE
Listeria monocytogenes DURANTE EL PROCESAMIENTO DE
BROCOLI PRECOCIDO Y CONGELADO”**

TESIS

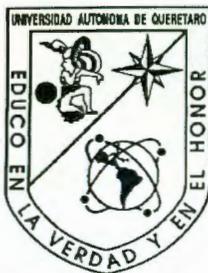
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS**

PRESENTA

BEATRIZ LILIANA ALVAREZ MAYORGA

QUERÉTARO, QRO., AGOSTO DE 1998

No Adq H58973
No. Tit. TS
Clas. 664.028.53
A473c



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

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

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

“CONTAMINACION, SOBREVIVENCIA Y DESARROLLO DE *Listeria monocytogenes*
DURANTE EL PROCESAMIENTO DE BROCOLI
PRECOCIDO Y CONGELADO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

BEATRIZ LILIANA ALVAREZ MAYORGA

DIRIGIDA POR

DR. EDUARDO FERNANDEZ ESCARTIN

SINODALES

DR. EDUARDO FERNANDEZ ESCARTIN

Presidente

M. en C. JOSEFINA SALDAÑA LOZANO

Secretario

M. en C. BLANCA E. GARCIA ALMENDAREZ

Vocal

M. en S.P. FAUSTO TEJEDA TRUJILLO

Suplente

DR. EDMUNDO MERCADO SILVA

Suplente

Q. JOSE MERCED ESPARZA G.

Director de la Facultad de Química

DRA. Ma. GUADALUPE BERNAL S.

Directora de Investigación y Posgrado

Este trabajo lo dedico con todo cariño y respeto a mi madre Josefina Mayorga, a quien agradezco todo, por ser mi mejor amiga, por confiar en mi, y permitirme con su apoyo, comprensión y sabios consejos llegar a las metas fijadas. A mi padre José Luis Alvarez, porque a pesar de todo sé que está conmigo. A mi abuela Aurora, por ser ella. A mis hermanos José Luis y Edgar, porque con su entusiasmo y alegría siempre me han aligerado la carga y motivado a seguir adelante. A mi esposo Miguel, porque entusiastamente celebra mis triunfos y los hace más hermosos, y por su apoyo incondicional en cualquier situación. A mi gran amiga Cuquis, por su sincera amistad, por todo el apoyo y por estar siempre.

Mi más profundo agradecimiento :

Al Dr. Eduardo Fernández Escartín, porque además de Director de Tesis, es un verdadero Tutor.

A la M. en C. Josefina Saldaña Lozano, por todos los conocimientos transmitidos, pero sobre todo por la gran amistad que me ha brindado.

A la I. en A. María del Refugio Pérez Barba y a la Q.F.B. Nora Espinosa Flores, porque sin ellas este trabajo no hubiera sido posible.

A la familia Rangel Ibarra, por todo el apoyo que siempre me han dado.

Al Ing. Alfredo Beltrán Mondaca, por las facilidades para la realización de esta investigación.

A la Universidad Autónoma de Querétaro.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A todos y cada uno de los que de alguna manera me apoyaron siempre.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química en la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la asesoría del Dr. Eduardo Fernández Escartín.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice de Tablas	i
Índice de Gráficas	ii
Índice de Esquemas	iii
I. Resumen	1
1. Summary	3
II. Introducción	4
III. Antecedentes	
1. Características y clasificación de <i>L. monocytogenes</i>	6
2. Listeriosis en humanos	13
3. Características de <i>L. monocytogenes</i> importantes en las plantas procesadoras de alimentos	20
3.1. Factores que afectan la sobrevivencia	20
3.2. Factores que afectan el desarrollo	32
4. Incidencia y comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en productos vegetales	34
5. Regulación	37
6. Plantas procesadoras	41
IV. Objetivos	
Objetivo general	43
Objetivos específicos	43

V. Trabajo experimental	
1. Materiales	44
2. Métodos	
2.1. Investigar la presencia de <i>L. monocytogenes</i> a lo largo del procesamiento del brócoli precocido y congelado incluido el equipo y otros factores potenciales de contaminación	47
2.1.1. Identificación de género y especie de <i>Listeria</i> mediante pruebas morfológicas, de cultivo, metabólicas, serológicas e hibridación de DNA	51
2.2. Determinar la sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> a la congelación en brócoli precocido	53
2.3. Evaluar la sanidad de la planta en base a organismos coliformes	56
2.4. Determinar la susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> a germicidas de uso común en plantas de alimentos	
2.4.1. Selección del vehículo del microorganismo previo al secado sobre placas de acero inoxidable	58
2.4.2. Susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> a compuestos clorados y un producto comercial a base de sustancias naturales (Citricidin ^{MR}), sobre superficies de acero inoxidable	60
2.5. Cuantificar el contenido de <i>L. monocytogenes</i> en muestras de producto precocido y congelado que resulten positivas a la prueba cualitativa	62
VI. Resultados y discusión	65
VII. Conclusiones	110
VIII. Bibliografía	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Diferenciación de especies de <i>Listeria</i>	7
2. Distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> dentro de la planta procesadora	68
3. Distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en brócoli según etapa de procesamiento	70
4. Distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en superficies de equipo según etapa de procesamiento	72
5. Especies de <i>Listeria</i> en las diferentes etapas de procesamiento de brócoli precocido y congelado	74
6. Distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> dentro de la planta procesadora (marzo '95 - noviembre '95)	75
7. Distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> dentro de la planta procesadora (diciembre '95 - marzo '96)	76
8. Distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en brócoli según forma comercial	78
9. Actividad de dos cepas de <i>L. monocytogenes</i> en brócoli cocido almacenado a temperatura ambiente	80
10. Actividad de dos cepas de <i>L. monocytogenes</i> en brócoli cocido almacenado a temperatura ambiente, con dos técnicas de recuento	81
11. Efecto del tiempo de revitalización en CST-EL en la recuperación de dos cepas de <i>L. monocytogenes</i> a partir de brócoli congelado	84
12. Recuperación de dos cepas de <i>L. monocytogenes</i> a partir de brócoli almacenado en congelación	85

13. Recuperación de dos cepas de <i>L. monocytogenes</i> a partir de brócoli almacenado en congelación, utilizando las técnicas de extensión en superficie (ES) y Miles-Misra (M-M)	86
14. Coliformes en el agua de enfriamiento del brócoli después del precocido durante una jornada de trabajo	88
15. Reducción de coliformes en el hidrogenfriador higienizado con técnica de espuma y cloración (100 mg/L)	92
16. Coliformes en brócoli en 3 etapas de procesamiento	93
17. Coliformes en el equipo antes y después de higienizar con técnica de espuma y cloración en el hidrogenfriador	96
18. Organismos coliformes en residuos de brócoli obtenidos durante 8 horas en 3 distintas localizaciones de la banda transportadora del hidrogenfriador	97
19. <i>L. monocytogenes</i> en residuos de brócoli obtenidos durante 8 horas en 3 distintas localizaciones de la banda transportadora del hidrogenfriador	99
20. Distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en brócoli precocido y congelado, enfriando con agua y con aire	101
21. Recuperación de <i>L. monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> inoculadas con dos vehículos en láminas de acero inoxidable	104
22. Sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> nativa a hipoclorito de sodio y Citricidin ^{MR} sobre superficies de acero inoxidable	105
23. Cuantificación del contenido de <i>L. monocytogenes</i> en muestras de producto terminado positivas a la prueba cualitativa	108

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica	Pág.
1. Distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> dentro de la planta procesadora	68
2. Distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en brócoli según etapa de procesamiento	70
3. Distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en brócoli según forma comercial	78
4. Actividad de dos cepas de <i>L. monocytogenes</i> en brócoli cocido almacenado a temperatura ambiente	80
5. Actividad de dos cepas de <i>L. monocytogenes</i> en brócoli cocido almacenado a temperatura ambiente, con dos técnicas de recuento	81
6. Recuperación de dos cepas de <i>L. monocytogenes</i> a partir de brócoli almacenado en congelación	85
7. Recuperación de dos cepas de <i>L. monocytogenes</i> a partir de brócoli almacenado en congelación, utilizando las técnicas de extensión en superficie (ES) y Miles-Misra (M-M)	86
8. Recuperación de <i>L. monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> inoculadas con dos vehículos en láminas de acero inoxidable	104
9. Sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> nativa a hipoclorito de sodio y Citricidin ^{MR} sobre superficies de acero inoxidable	105

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema	Pág.
1. Proceso del brócoli precocido y congelado	48
2. Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> dentro de la fábrica (superficies de equipo)	49
3. Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> en brócoli dentro de la fábrica	50
4. Identificación de género y especie de <i>Listeria</i> mediante pruebas morfológicas, de cultivo, metabólicas, serológicas e hibridación de DNA, a partir de las colonias desarrolladas en los medios selectivos	52
5. Sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> a la congelación en brócoli precocido	55
6. Evaluación de la sanidad en base a los organismos coliformes	57
7. Selección del vehículo para la inoculación del microorganismo sobre placas de acero inoxidable	59
8. Susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> a compuestos clorados y un productos comercial a base de sustancias naturales (Citricidin ^{MR}) sobre superficies de acero inoxidable	61
9. Cuantificación del contenido de <i>L. monocytogenes</i> en muestras de producto precocido y congelado que resulten positivas a la prueba cualitativa	63

I. RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio sobre el perfil de contaminación de *Listeria monocytogenes* en una planta moderna procesadora de brócoli precocido y congelado, y de algunos factores que determinan la presencia del germen en el producto terminado. Se estudió además la sobrevivencia de dos cepas de *L. monocytogenes* (Scott A y otra nativa que aislamos de brócoli precocido y congelado) a la congelación. Para su exportación, la planta debe satisfacer la norma de ausencia de *L. monocytogenes* en porciones de 25 g de alimento. Utilizando las técnicas de la FDA (Food and Drug Administration) y de la USDA (U.S. Department of Agriculture) la positividad a *Listeria* spp resultó de 11% en el producto crudo, y de 42% en el producto ya precocido y congelado. Específicamente, *L. monocytogenes* se recuperó en 3 de 101 muestras (3%) en el primer caso y en 45 de 127 (35%) del segundo. El NMP de *L. monocytogenes* entre 7 de las muestras positivas de producto terminado osciló entre <0.03 y 2.0 /g, la mayor parte de las veces 0.04 /g. Este reducido número es suficiente para obtener un resultado positivo cuando se analizan 25 g de producto. La distribución del patógeno en las distintas formas de presentación del brócoli procesado, mostró un claro predominio en el florete (87%), seguido de los cortes (34%), el picado (26%) y las lanzas (16%). En el equipo de procesamiento *L. monocytogenes* fue detectada en la entrada y salida del congelador IQF (Individual Quickly Frozen) con una positividad del 2% en ambos casos. La aplicación de 200 mg/L de cloro libre durante 5 minutos sobre superficies de acero inoxidable, redujo al menos 5 log el número de sobrevivientes. El Citricidin^{MR}, un germicida que se fabrica a partir de semillas de toronja, mostró una eficiencia mayor a la del hipoclorito, considerando que la disminución del número de células viables fue similar (al menos 5 log), pero requirió menos tiempo (3 min.) con 200 mg/L. Cuando la cepa Scott A de *L. monocytogenes* se inoculó en brócoli recién cocido y se almacenó a 22-25°, el germen se multiplicó elevando su número poco más de 4 veces en sólo 2.5 h; el incremento

con una cepa nativa, que aislamos del brócoli, fue de casi 14 veces. La cepa Scott A mostró mayor capacidad de sobrevivir a la congelación que la nativa: se recuperó después de 11 semanas a -18°, en tanto que la cepa nativa sólo sobrevivió 4 semanas. Ni el empleo de agua a 3° para el enfriamiento, con una concentración sostenida de 17 mg/L de cloro activo en el agua de enfriamiento, permitió obtener un producto precocido y congelado libre de *L. monocytogenes*. La sustitución del hidrogenfriador por un sistema de enfriamiento con aire, redujo considerablemente el problema de la recontaminación del brócoli cocido previo a la congelación. Un programa completo de higienización del equipo, sistemático y regularmente verificado, especialmente después de la etapa de cocción, integrado a prácticas sanitarias de operación, y la sustitución del hidrogenfriador por el sistema de enfriamiento con corriente de aire, es un complemento esencial, pero seguro (instrumentado en principio dentro de un sistema de ARPCC), para satisfacer sistemáticamente la norma de ausencia de *L. monocytogenes* en porciones de 25 g de brócoli precocido y congelado.

1. SUMMARY

We studied in a modern processing plant of pre-cooked frozen broccoli the contamination profile of *L. monocytogenes* and some factors that influence the presence of this bacterium in the finished product. Survival of two strains of *L. monocytogenes* to frozen storage was also studied. The presence of *Listeria* spp. was demonstrated in 11% of raw broccoli and 42% of pre-cooked frozen broccoli using the FDA and the USDA technique. *L. monocytogenes* was isolated in 3% and 35% respectively. The MNP of *L. monocytogenes* (7 samples) ranged from <0.03 to 2.0/g. The pathogen was present in 87% of florets, 34% of cuts, 26% of chopped and 16% of spears. It was not possible to eliminate *L. monocytogenes* in precooked frozen broccoli by keeping water of hydrocooler at 3° and with 17 mg/L of free chlorine. In cooked broccoli stored at 22-25°, *L. monocytogenes* Scott A increased its concentration for four times in only 2.5 h ; with a native strain isolated from broccoli, the increment was 14 times in the same period. *L. monocytogenes* Scott A strain showed a higher potential to survive under frozen condition (11 weeks) than the native strain did it (4 weeks). The replacement of the hydrocooler by aircooler system in the plant, reduced notoriously the level of recontamination of cooked broccoli, previously to freezing.

II. INTRODUCCIÓN

EL PROBLEMA

La listeriosis es una zoonosis de baja morbilidad, pero alta letalidad en el hombre, transmisible por alimentos. Estos incluyen una diversidad, tanto de origen animal como vegetal, y crudos o procesados. En algunos brotes se han identificado a las verduras como vehículo del agente etiológico. Por lo anterior, y en parte por el desconocimiento de la dosis mínima infectante del microorganismo, en los países importadores se ha establecido una norma para *Listeria monocytogenes*, de 0 es decir, negativo, en porciones de 25 g de alimento listo para su consumo (84). El germen tiene muy amplia distribución en la naturaleza, lo que propicia que los alimentos se contaminen con cierta facilidad; así, el cumplimiento de la norma mencionada entraña algunas dificultades técnicas. En la región del Bajío existen 10 plantas procesadoras de frutas y verduras, la mayoría exportadoras. Las exportaciones de brócoli precocido y congelado a Estados Unidos han aumentado de 27.7 millones de toneladas de libras en 1983 a 214.7 en 1991 (3). El valor comercial de la exportación en 1990 fue de 68.8 millones de dólares. La aplicación de la norma microbiana se viene ejerciendo de manera progresivamente más rígida. Algunos exportadores han resentido la devolución de embarques de producto congelado por insatisfacción de esa norma. Tanto en los exportadores como en los importadores, se advierte tendencia a insistir en la implementación del Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos de Control Crítico (ARPC), como condición para sostener sus operaciones comerciales. La aplicación del sistema requiere amplia información sobre una diversidad de factores, tales como la incidencia y distribución del germen en los productos crudos, la caracterización de cepas de diversas fuentes en lo concerniente a su comportamiento a bajas temperaturas, susceptibilidad a germicidas, el potencial para desarrollar sobre las

verduras crudas y cocidas, la sobrevivencia a la congelación, y los posibles mecanismos de contaminación dentro de las plantas procesadoras. En nuestro país, con una limitada tradición en el control y aseguramiento de la inocuidad microbiana de los alimentos, y escasez de estudios sobre la ecología y el comportamiento de los microorganismos de interés sanitario en los alimentos, entre otros motivos, surgen limitaciones serias para una aplicación técnicamente fundamentada del sistema de ARPCC. El interés central de este trabajo consiste en evaluar los factores que propician la presencia de *L. monocytogenes* en brócoli precocido y congelado dentro de una planta procesadora, y derivar de ahí principios que conduzcan a la obtención de productos que satisfagan la norma de 0 *L. monocytogenes* en porciones de 25 g de alimento. De esta manera será posible abatir de manera significativa (por parte de los importadores), los rechazos de lotes de productos contaminados por microorganismos objetables; las consecuencias directas serán un producto más seguro y menores pérdidas económicas por concepto de devoluciones de lotes contaminados (transporte bajo congelación, horas de labor perdidas, posible pérdida de mercados). El mejoramiento de la calidad microbiana de los productos de consumo doméstico, contribuirá a disminuir la incidencia de algunas enfermedades transmisibles por alimentos en nuestro país.

III. ANTECEDENTES

1. CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN DE *L. monocytogenes*

El germen objeto de estudio en este trabajo, *L. monocytogenes*, es la única especie dentro del género reconocida como patógena para el humano, aunque existen algunos reportes de casos en donde se han involucrado otras dos especies: *L. ivanovii* y *L. seeligeri* (78). El Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey en su novena edición (118) enlista 8 especies dentro del género *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. murrayi*, y *L. denitrificans*. Recientemente, *L. denitrificans* ha sido asignada a un nuevo género, *Jonesia* (60).

Stuart y Welshimer (60) en 1974 propusieron una nueva familia, *Listeriaceae*, con dos géneros, *Listeria* y *Murraya*, con lo cuál *Listeria* consiste de un grupo heterogéneo de organismos distinguibles de *Murraya* spp. por su incapacidad para fermentar el manitol. El género *Murraya* contiene dos subespecies, *M. grayi* spp. *grayi* y *M. grayi* spp. *murrayi*, diferenciables por la habilidad tardía de reducir los nitratos (60).

L. monocytogenes es un bacilo pequeño de 1-2 X 0.5 μm , gram-positivo, no esporulado, pleomórfico con extremos redondeados (69, 136); células jóvenes de *Listeria* pueden aparecer como diplococos o cocos (109, 136). Los cultivos recientes son sin excepción, gram-positivos; sin embargo, la observación de cultivos “viejos”, de 2-5 días, comúnmente revelan células gram-negativas (69). El germen es un peritríco móvil con singular “acrobacia” que puede ayudar a la identificación de la bacteria. Esta movilidad se observa mejor en cultivos de caldo triptosa incubados a 20°; incubar a 37° puede ocasionar un daño reversible a uno de sus seis flagelos, o inducir el desarrollo de un sólo flagelo (109). Es posible diferenciar con alto grado

de confiabilidad las especies de *Listeria* en función de atributos fisiológicos como se indica en la Tabla 1. No es una bacteria esporulada (109); sin embargo, muestra una termorresistencia algo mayor que la de las células vegetativas de otras bacterias patógenas. Es un microorganismo aerobio facultativo (109).

Todas las especies del género muestran capacidad de hidrolizar la esculina, cualidad muy utilizada en el desarrollo de medios de cultivo diferenciales para su aislamiento; presentan el fenómeno de iridiscencia cuando se hace incidir luz sobre las colonias en medios de cultivo, conocido como transiluminación de Henry (37).

Tabla 1

DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DE *Listeria*

<i>Listeria</i> sp.	Gram	Esc.	Cat.	RM	VP	Man.	Xil.	Ram.	Henry	β -hemólisis
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>L. ivanovii</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>L. innocua</i>	+	+	+	+	+	-	-	v	+	-
<i>L. welshimeri</i>	+	+	+	+	+	-	+	v	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	+	+	+	-	v	-	+	v
<i>L. denitrificans</i> *	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>L. murrayi</i>	+	+	+	+	+	+	-	v	+	-
<i>L. grayi</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-

Esc.- Esculina

Man.- Manitol

Cat.- Catalasa

Xil.- Xilosa

RM - Rojo de metilo

Ram.- Ramnosa

VP - Voges Proskauer

* Reclasificada como *Jonesia denitrificans*

v = variable

Fuente: Ryser, E.T. y Marth, E. H. (ref. 109).

Son patrones cruciales para la diferenciación de las otras especies de *Listeria*, la fermentación de la ramnosa y xilosa. Ni *L. monocytogenes*, ni *L. innocua* fermentan la xilosa; y aunque ambas fermentan la ramnosa, algunas cepas de *L. innocua* no lo hacen (Tabla 1). Las dos especies pueden ser separadas, sin embargo, por la ausencia de actividad hemolítica en esta última (60). *L. monocytogenes* y *L. innocua* están relacionadas muy cercanamente, y estudios recientes han confirmado que dentro de las rRNA 16s, hay sólo 2 de 1281 pares de bases, que son diferentes entre ambas especies (43).

Las únicas especies que se reportan como productoras de β -hemolisina son *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, las cuales han sido involucradas en brotes de listeriosis. Se ha reportado que la producción de dicha hemolisina se relaciona con la virulencia. Las especies hemolíticas pueden separarse en función de la prueba de Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) (123).

L. monocytogenes puede crecer entre 1 y 45°, con crecimiento óptimo entre 30 y 37°. Si bien el crecimiento a 3-4° es lento, la turbidez en caldo o el crecimiento en un medio sólido puede observarse en 5-8 días. A 6°, la fase log es alcanzada en 5-11 días (7). Se considera un microorganismo psicrótrofo con desarrollo a tan bajas temperaturas (7, 136), como 4°, comúnmente observada en la refrigeración comercial. En caldo soya tripticasa (CST) a pH 7.0 el tiempo de generación es de 39.8 min., a 37° de 52.3 min., y a 45° de a 33.5 h (102). Puede desarrollar a valores de pH que van desde 5.6 a 9.6, con óptimo en valores cercanos a la neutralidad o ligeramente alcalinos. En CST incubado a 30° el tiempo de generación varía de 371 min. a pH 4.7, 44.7 min. a pH 7.0, y 179 min. a 9.2. Fuera de éstos límites no se presenta crecimiento (102).

L. monocytogenes puede reproducirse en medios simples que contengan hidrolizados de caseína o gelatina con glucosa, que es el carbohidrato ideal para su crecimiento; no puede ser reemplazada como fuente de energía o carbono por gluconato, xilosa, arabinosa, o ribosa. Los compuestos intermediarios de los ciclos del

piruvato y del citrato son inadecuadas fuentes de carbono y energía. La sangre y el suero, no son requerimientos estrictos; sin embargo, ambos aumentan la biomasa del organismo en medios con factores de crecimiento reducidos. La presencia de fierro, magnesio, calcio, potasio y fosfato, es necesaria para el crecimiento. Aunque no es indispensable incrementar los niveles de tiamina para el crecimiento, ayuda a obtener colonias de tamaño razonable. La riboflavina sola, ó en combinación con biotina, estimulan el crecimiento (109).

Aunque el aislamiento de *L. monocytogenes* puede implicar algunas dificultades ocasionales, una vez aislado el organismo crece con facilidad en medios bacteriológicos comunes como el agar triptosa. Este medio es excelente para mantener y almacenar los cultivos a 3° (109). Para su aislamiento a partir de alimentos, anteriormente se utilizaban enriquecimientos en frío aprovechando la habilidad de crecer a temperaturas de refrigeración. Este enriquecimiento permitía crecer a *L. monocytogenes* a expensas de la inhibición de las bacterias no psicrótrofas; sin embargo, los métodos requieren semanas o meses. Debido a que el tiempo es crítico, actualmente este tipo de enriquecimiento ha sido sustituido por la incorporación de diversos agentes antimicrobianos selectivos como cicloheximida, ácido nalidíxico, moxalactamo, acriflavina y colistina, que inhiben la mayor parte de flora asociada que suele estar presente en los alimentos, y permiten el desarrollo de *L. monocytogenes* (44).

Un problema en el uso de los antimicrobianos es que en algunos casos se trata de sustancias muy peligrosas. Así ocurre con la cicloheximida, que se adiciona para prevenir el crecimiento de hongos, y la acriflavina para inhibir los cocos gram-positivos. La cicloheximida es una sustancia extremadamente tóxica con valores de LD₅₀ para ratas de 2 mg/kg. de peso corporal y 5 mg/kg. para humanos. Esta sustancia ha mostrado ser genotóxica (9) y teratogénica (113). La acriflavina se ha reportado como mutágena (110) y carcinógena (113). Ambas sustancias irritan ojos, piel y sistema respiratorio. Por ello son un riesgo para las personas que manipulan las

sustancias al preparar los medios de cultivo (81). Recientemente se han realizado estudios que proponen el uso de sustancias menos peligrosas y que tengan la misma eficiencia en los medios de enriquecimiento y aislamiento; entre ellas están la natamicina y la bacitracina (81).

Entre los ingredientes de los medios de cultivo con valor selectivo para la *L. monocytogenes* se encuentran la natamicina (pimaricina), antibiótico producido por *Streptomyces nataliensis*. Su uso es permitido para evitar el desarrollo de hongos en quesos y salchichas. El moxalactamo, un β -lactamo, es un antibiótico usado en medicina humana, que no tiene efecto tóxico (82). La bacitracina se usa para promover el crecimiento de animales. El moxalactamo inhibe el crecimiento de bacterias gram-positivas y la bacitracina inhibe el de bacterias gram-positivas y de algunas gram-negativas, como *Pseudomonas* spp. La natamicina se usa exitosamente como un fungistático en medios de cultivo bacteriológicos (81).

Tres métodos para aislar y/o identificar *L. monocytogenes* son de uso común en el laboratorio. El primero, para el recuento directo en placa a partir de una suspensión del alimento. El segundo, cualitativo, utiliza una o más etapas de enriquecimiento, seguidas de aislamiento en placa de un agar selectivo, y corresponde a los métodos de la FDA, Food and Drug Administration (43, 60) y de la USDA, U.S. Department of Agriculture (44). Los caldos de enriquecimiento son generalmente caldos nutritivos que contienen diversos antimicrobianos para los cuales *L. monocytogenes* es resistente. El tercer grupo incluye a los llamados métodos rápidos: ELISA, hibridación del DNA, flujo citométrico (44, 108) y reacción de polimerasa en cadena (32).

Cuando los alimentos se someten a diversos procesos para prevenir el deterioro microbiano, con frecuencia algunos microorganismos sufren daños subletales debido al estrés al que son sometidas (59). En esta condición muestran una especial hipersensibilidad (59) hacia los agentes selectivos que se utilizan en los medios de cultivo. Como resultado del calentamiento o la congelación, la mayoría de los microorganismos presentan un daño metabólico, resultando en la inhabilidad para

recuperarlo y formar colonias en medios selectivos donde normalmente se soporta bien el crecimiento (79). Diversas investigaciones han demostrado que las bacterias dañadas subletalmente incrementan los requerimientos nutricionales (19, 71) La adición de sustancias que pudieran revitalizar a las células de *Listeria*, como el piruvato de sodio, se sugieren en los casos donde el germen pudiera estar estresado, como el caso de alimentos congelados (60). En una situación ideal, el método y los medios de cultivo deben detectar tanto células normales como células fisiológicamente dañadas; de esta manera, dichas células pueden repararse, realizar sus funciones normalmente y recuperarse en el medio selectivo (125).

La adición de diversos nutrientes (tripticasa, peptona, ácido casamino, extracto de levadura, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico y mezcla de aminoácidos) a un medio mínimo, ayuda a reparar el daño subletal que haya sufrido el microorganismo. También compuestos como fosfato de sodio y potasio, piruvato, citrato y ATP ayudan al proceso de reparación. Esta se puede completar en 30 min. y la multiplicación celular comenzará después de aproximadamente 3 o 4 horas a 20° (50).

Las técnicas recomendadas por la FDA y la USDA permiten detectar la presencia de *Listeria* spp (24).

Con frecuencia la cuantificación de *Listeria* es esencial, dado que la probabilidad del riesgo para el consumidor está directamente relacionada con el número presente en el alimento. Sin embargo, el desarrollo de un método para el recuento de *Listeria* spp. a partir de alimentos ha sido muy difícil; a ello contribuye la baja concentración de *Listeria* spp. (generalmente menos de 10^2 ufc/g), a la alta concentración de microflora competitiva que suele encontrarse en los alimentos (24, 89), y al hecho de que *Listeria* no se encuentra distribuida homogéneamente en los alimentos. En los quesos por ejemplo, la bacteria se distribuye principalmente en la corteza, de manera irregular, formando microcolonias en algunos casos (76). Por otra parte, una determinación cuantitativa para un cierto alimento al tiempo de su producción, no siempre es representativa del número de bacterias existentes al tiempo

de consumo, dado que *Listeria* puede multiplicarse durante el almacenamiento, aún en refrigeración (76). La técnica del número más probable (NMP) esta basada en dos presunciones. La primera es que el organismo se encuentra aleatoriamente distribuido en la muestra. La segunda es que el medio inoculado con una dilución particular mostrará crecimiento si uno o más organismos están presentes, cuando se incuba adecuadamente (24). El uso de pruebas de DNA resulta apropiado para la cuantificación cuando el número de *Listerias* está por arriba de 10 ufc/g (41).

Basándose en los métodos serológicos de Kauffmann y White, Paterson en 1940 (98, 99) describió cuatro tipos para *L. monocytogenes* basado en los antígenos, somático (O) y flagelar (H). Se diferenciaron los serotipos 1,3 y 4 en función de los antígenos O, mientras que la identificación del serotipo 2 se basó en un único antígeno H. Seeliger subdividió el serotipo 4 en los serotipos 4a y 4b, y Donker-Voet adicionó los serotipos 4c, 4d, y 4e a la lista (119).

Actualmente se conocen 13 serotipos de *L. monocytogenes* caracterizados en base a 15 antígenos somáticos y 4 flagelares. Algunos de estos serotipos no tienen capacidad patógena, por lo que su presencia en los alimentos no presenta riesgo a la salud. Más del 95% de los casos de listeriosis son causados por los serotipos 1/2a, 1/2b, y 4b. El serotipo 4b provocó todos los brotes por alimentos en Europa y Norteamérica desde 1981 hasta 1994, mientras el serotipo 1/2b causó un brote en Estados Unidos (137).

2. LISTERIOSIS EN HUMANOS

Tres de las ocho especies de *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, y *L. seeligeri*) pueden causar infección en humanos y/o animales. Aunque se ha reportado *L. ivanovii* en aproximadamente el 10% de los casos de listeriosis animal en Bulgaria, este organismo generalmente se considera menos virulento que *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* es responsable de virtualmente todos los casos de listeriosis humana, y aproximadamente del 90% en los animales (109).

En 1987, Gaillard y col. (61), sugieren que el tracto intestinal puede ser el sitio primario de entrada de *L. monocytogenes*. La aparición de síntomas gastrointestinales al inicio de la enfermedad y la relación ahora bien establecida con el consumo de alimentos contaminados en al menos 4 brotes de listeriosis, permite suponer que la listeriosis puede ser predominantemente una infección de origen alimentario (109).

Este microorganismo es relativamente resistente al ácido, por lo que es muy factible, que atraviese la barrera gástrica sin que haya un daño importante en las células. Esta observación es aplicable en especial a recién nacidos, cuya producción de ácido en el estómago es menor que en el adulto (76). Aunque el carácter patógeno de *L. monocytogenes* se conoce desde hace más de 60 años, el mecanismo por el cual causa la enfermedad parece ser sumamente complejo. El proceso se ha dividido en tres etapas: (a) penetración en el huésped, (b) sobrevivencia y multiplicación dentro del huésped, y (c) invasión del tejido susceptible (109).

Una vez ingerida, *L. monocytogenes* penetra la mucosa intestinal y comienza a multiplicarse. Así, esta bacteria puede ser clasificada como un patógeno enteroinvasivo. Al menos dos teorías se han propuesto en relación con el sitio de penetración y multiplicación. De acuerdo a Racz y col. (106) en 1972, las células epiteliales de la mucosa intestinal sirven como sitio de entrada y de multiplicación bacteriana antes de que se inicie la fagocitosis por los macrófagos de la pared intestinal. En contraste, MacDonald y Carter (91) en 1980 sugieren un proceso de dos

fases: *L. monocytogenes* primero cruza la barrera intestinal y después de ser fagocitadas por los macrófagos comienza la replicación. El poder patógeno de este microorganismo le permite no sólo sobrevivir a la digestión de los macrófagos, sino destruirlos y liberarse a la circulación.

Después de la invasión de los macrófagos, las cepas virulentas de *Listeria* pueden multiplicarse, y destruir las células, y provocar septicemia. A partir de la sangre tiene acceso a todas las áreas del cuerpo incluidos el sistema nervioso central, el corazón, los ojos y otras localidades, así como el feto en la mujer embarazada (90). De esta manera el daño se traduce en un aborto o en meningoencefalitis (109).

La técnica más confiable para determinar la patogenicidad de una cepa de *L. monocytogenes* consiste en su inoculación a animales (109). En el ensayo de patogenicidad en ratón, se inyectan intraperitonealmente animales de 16-18 g con $\sim 10^9$ células. Las cepas patógenas normalmente matan a los 5 animales dentro de 7 días. Esta prueba debe ser acompañada con el ensayo de cepas de *Listeria* conocidas como patógenas (*L. monocytogenes*), y no patógenas (*L. innocua*) (88).

Hay que destacar que dentro de la amplia ubicuidad del microorganismo pueden encontrarse tanto cepas virulentas como avirulentas. La importancia de los alimentos como vehículo de transmisión de listeriosis ha sido reconocida sólo recientemente (8, 47, 58, 114). Cuando se mencionaba una enfermedad transmitida por alimentos hace 50 años, el término frecuentemente se asociaba con tuberculosis, brucelosis, y faringitis. Estas afectan otros órganos del cuerpo que no incluyen el tracto gastrointestinal. Cuando aquellas fueron controladas, la atención se orientó a enfermedades asociadas con el tracto gastrointestinal. Fueron incluidas intoxicaciones estafilococcicas, salmonelosis, yersiniosis, campylobacteriosis, y otras. Recientemente, se ha cerrado el círculo y nuevamente se involucra un padecimiento que afecta otros órganos excluyendo el tracto gastrointestinal, la listeriosis. De hecho la enfermedad tiene muchas caras y puede provocar una variedad de síntomas (48).

La infección por *L. monocytogenes* es un acontecimiento común. Existen amplias oportunidades de ingestión del microorganismo, debido a su amplia distribución en la naturaleza. El desarrollo de la enfermedad en la población, sin embargo, es raro (76). No basta el simple contacto con *L. monocytogenes*, lo que sugiere que algunas personas tienen resistencia a la infección por la bacteria; o de otro modo, ciertos grupos de la población se muestran hipersensibles. Se han recuperado cepas que reaccionan positivamente a las pruebas de patogenicidad a partir del tracto gastrointestinal de individuos asintomáticos, incluyendo aquéllos con alto riesgo, como mujeres embarazadas o personas que han recibido transplantes. Lo anterior, aunado al reconocimiento de que es un organismo del suelo que puede ser aislado a través de la cadena alimentaria (92), subraya que la mera exposición no conduce obligadamente a la enfermedad. Afortunadamente, como se anotó, el número de listerias en los alimentos suele ser muy bajos (89).

Bajo las circunstancias actuales, cualquier persona puede infectarse con *L. monocytogenes*, pero muchas de ellas, permanecer asintomáticas. Los grupos de población, en la que una infección puede amenazar la vida incluye (92):

Fetos y recién nacidos.

Personas con sistema inmune dañado.

Mujeres embarazadas (especialmente en el segundo y tercer trimestre).

Ancianos.

Personas bajo terapia con corticosteroides, hemodiálisis, u otros tratamientos.

Personas con leucemia, SIDA, u otras enfermedades que afecten el sistema inmune.

Los factores que afectan la susceptibilidad del huésped a la listeriosis son: la afectación de la resistencia a la colonización en tracto gastrointestinal, generalmente asociada al uso de antibióticos y debida a la destrucción de la microflora del intestino;

disminución de la acidez gástrica; ó una enfermedad concurrente del tracto gastrointestinal que afecte la integridad de la mucosa (92).

Schuchat y col. (116) en 1992 reportaron que la incidencia de listeriosis invasiva en California, Tennessee, Georgia y Oklahoma fue de 7.4 casos por millón de habitantes; el 2.3% de las infecciones resultó letal. El 69% de los casos en hombres y mujeres no embarazadas ocurrieron en pacientes con cáncer, personas con SIDA, receptores de transplantes de órganos, o que habían recibido terapia con corticosteroides. Algunos de los pacientes inmunocomprometidos consumieron pollo deficientemente cocido, lo que incrementó el riesgo de listeriosis (116).

La septicemia es la manifestación más común en adultos. La fiebre es un síntoma común, y puede observarse desde fatiga no específica y malestar general hasta síntomas entéricos. La muerte es rara en adultos sanos; sin embargo, la tasa de letalidad es de aproximadamente 30% en los inmunocomprometidos o recién nacidos (90). La listeriosis humana se caracteriza comúnmente por formación de granulomas miliares (masa de tejido inflamado por encima de lesiones pequeñas) y gangrena focal o supuración del tejido infectado (109).

La incidencia de la listeriosis muestra una clara tendencia ascendente en muchos países. La literatura registraba sólo 36 casos de listeriosis en humanos hasta 1945. Desde entonces, el número de casos reportados en el mundo se incrementó hasta aproximadamente 1000 en 1960 y 1500 en 1962 (109). En 1972, Seeliger (119) estimó el número total de casos de listeriosis humana en aproximadamente 5000. Durante los 70s, se observaron ligeros incrementos en el número de casos de listeriosis en Inglaterra, Francia, y España; una tendencia similar ocurrió durante los 80s en Bélgica, Dinamarca, Francia y Suiza (109). Los casos esporádicos de listeriosis se han incrementado hasta más de 1600 por año, con unas 400 muertes (72).

Se advierte un dramático incremento de listeriosis en los Estados Unidos durante 2 períodos 1933-1966 y 1970 a 1977. La incidencia de listeriosis en California, Nueva York, e Illinois fue similar al promedio nacional de 0.65 casos/10⁶ personas

para el período de 1970-1977 (109). El Centro de Control de Enfermedades reporta anualmente en los Estados Unidos aproximadamente 1700 casos de listeriosis con 450 muertes (~ 6.7 casos/ 10^6 de población) (64). En 1986 se registraron 39 casos en Austria, 811 en Francia, y 134 en Inglaterra (109). En la ciudad de Los Angeles se reportaron 94 casos de listeriosis durante el período comprendido entre agosto de 1985 y septiembre de 1986, y 64 casos durante 1987; esto significa una incidencia anual de ~ 8.5 casos/ 10^6 de población. Al parecer la incidencia de listeriosis en los Estados Unidos ascendió aproximadamente 10 veces en los últimos 15 años. Sin embargo, el acentuado incremento es el resultado del brote de listeriosis en el Sur de California que fue por consumo de queso estilo mexicano.

Los datos de listeriosis en Canadá entre 1971 y 1982 revelan una desproporcionalidad entre la alta incidencia en Nueva Escocia (2.68 caso/ 10^6 de la población) y Prince Edward Island (2.61 casos/ 10^6 de la población) comparado con el resto de las provincias (promedio de 0.63 casos/ 10^6 de la población). La alta incidencia en Nueva Escocia es el resultado directo de un brote de origen alimentario ocurrido en 1981, donde el alimento implicado fue ensalada de col: Aunque este brote fue oficialmente responsable de solo 41 casos, en 1981 fueron reportados 83 casos, 82 de los cuales se debieron a *L. monocytogenes* serotipo 4b (109). En Europa la prevalencia de listeriosis varía entre los diferentes países, con un promedio anual de 0.04 a 3.70 casos/ 10^6 de población para el período 1949 - 1986. Más recientemente en Francia, la lengua de puerco fue el vehículo en 279 casos a lo largo de 10 meses en 1992 (68). Diversas conservas de puerco fueron incriminadas en 25 casos en 1993 (53). En 1981, se presentó un brote en las Provincias Marítimas de Canadá, donde el vehículo involucrado fue ensalada de col, preparada con productos obtenidos de una granja donde se había reportado listeriosis ovina. Treinta y cuatro casos de listeriosis perinatal y 7 casos la enfermedad en adultos ocurrieron entre marzo 1 y septiembre 1 de 1981. Los casos de listeriosis perinatal se caracterizaron por fiebre aguda en la mujer embarazada, seguido de aborto espontáneo (5 casos), muerte neonatal (4 casos), parto

vivo de un enfermo severo prematuro (23 casos), y parto vivo de un bebé sano (2 casos) (114).

Los alimentos identificados como vehículos en los brotes de listeriosis incluyen leche, quesos, productos cárnicos, huevos de aves, pescado y **verduras** como col, champiñones y alfalfa; también hay casos de transmisión por lechuga, apio y jitomate. Las frutas y verduras aparecen con menor frecuencia como fuente de *L. monocytogenes* (27). Sin embargo, se conocen epidemias de listeriosis de origen alimentario con alta tasa de letalidad (aproximadamente 30%) lo que ha generado preocupación respecto a la incidencia y control de *L. monocytogenes* en los proveedores de alimentos y el medio ambiente. El consumo de verduras crudas, especialmente apio, tomates y lechuga, fueron implicados en un brote de listeriosis en Boston en 1979 (101). Otro brote en 1981 estuvo asociado al consumo de col cruda, y otros en 1985 por lechuga, apio, y tomates (72). Las ensaladas de verduras crudas son un material que se considera fuente potencial de *Listeria monocytogenes*; ya que ésta ha sido aislada de la tierra y la vegetación (72, 139, 140, 141), así como de individuos y animales tanto sanos como enfermos (62).

La dosis mínima infectante de *L. monocytogenes* para los humanos se desconoce. Para un determinado patógeno el valor depende de varios factores como la condición del huésped, la virulencia de la cepa, el tipo y cantidad de alimento consumido, y la concentración del patógeno en el alimento (107). De los datos reportados en los alimentos responsables de brotes y casos esporádicos por *Listeria*, la evidencia disponible sugiere que se trata de números muy bajos. Debido sin embargo, al tiempo transcurrido desde el consumo hasta la detección del alimento contaminado, las cifras disponibles deben interpretarse con reservas, ya que, según hemos señalado, el organismo puede haberse multiplicado o disminuir su número durante el período intermedio (107). A pesar de la severidad de la enfermedad, la presentación en forma de brotes, y la elevada letalidad (que puede ser de hasta 30% o más), en nuestro país es un problema de salud pública escasamente reconocido.

Ha sido observada recientemente una resistencia a algunos antibióticos en *L. monocytogenes*, aunque raramente es detectada en cepas silvestres aisladas de especímenes humanos (107). La excepción se encuentra en la tetraciclina; la resistencia se puede originar a partir de un intercambio directo de información genética entre enterococos y *Listeria* en el intestino humano (46, 105). Para el tratamiento generalmente se recomienda la combinación de ampicilina y gentamicina o cotrimoxazola (107).

El problema de la *L. monocytogenes* en los alimentos, específicamente en el brócoli, incluye las oportunidades de contaminación, el potencial de sobrevivir a los tratamientos aplicados y finalmente la capacidad para desarrollar en el alimento. Entre las fuentes de contaminación hay que destacar superficies de contacto directo con el producto, artículos como la ropa o los guantes que pueden entrar en contacto directo con el producto, piso, paredes, drenajes y enfriadores de producto (14, 135). Es posible detectarlo incluso entre los manipuladores de alimentos (83).

3. CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES DE *Listeria monocytogenes* EN LAS PLANTAS PROCESADORAS DE ALIMENTOS.

Una vez que el alimento llega a contaminarse con *L. monocytogenes* en una planta procesadora, diversos factores determinan que finalmente el germen sobreviva, se multiplique o se inactive. Su conocimiento es fundamental para establecer normas de operación que permitan eliminar su presencia en el alimento procesado. El potencial del crecimiento para *L. monocytogenes* es un hecho de gran importancia en la medicina, la inocuidad de los alimentos, o la industria de productos agrícolas, debido a que *L. monocytogenes* es un microorganismo patógeno psicrótrofo (5).

3.1 FACTORES QUE AFECTAN LA SOBREVIVENCIA.

ALTA TEMPERATURA.

La sobrevivencia de *L. monocytogenes* al calor fue motivo de debate por algún tiempo. No es una bacteria esporulada; incluso no se reconoce como termodúrica (109). Sin embargo, por algún tiempo se consideró la posibilidad de que sobreviviera a la pasteurización (48, 49, 90). Se han realizado diversos estudios para evaluar su capacidad para sobrevivir al calor (23, 30, 31, 39, 49). La idea de sobrevivir a la pasteurización se originó en el estudio de un brote de listeriosis debido al consumo de leche pasteurizada que había sido procesada en una planta en la que no se encontraron evidencias de contaminación postpasteurización. La leche cruda provenía de una granja con casos de listeriosis clínica en algunos animales (58). Una explicación consistió en la posible protección del patógeno dentro de leucocitos en la leche del animal enfermo, ya que *L. monocytogenes* es un parásito intracelular (34, 58, 49).

La aplicación de tratamientos térmicos de cocción ordinarios, (60-70° actual de calentamiento) por algunos minutos la inactivan (136). El valor D a 71.7° reportado por algunos autores es de 0.9 s, indicando que 15 log de *L. monocytogenes* por mililitro de leche cruda pueden ser inactivados si se calienta a 71.7° por 15 s. Este es el tratamiento térmico mínimo que debe recibir la leche en una pasteurización HTST (High-temperature, short-time) (30, 31).

En el estudio de Doyle y col. (49) en 1987, se investigó el comportamiento de *L. monocytogenes* dentro de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) de leche que provenía de vacas infectadas artificialmente con *L. monocytogenes*. Las bacterias sobrevivieron a una pasteurización HTST (72.2° por 16.4 s.). Por lo tanto, la presencia de *L. monocytogenes* dentro de LPMN podría ser un factor importante que afecte la sobrevivencia del organismo en la leche calentada a 72.2° por 16.4 s. (49). *Listeria* se mantiene dentro de los LPMN en un estado fisiológico diferente al de las listerias suspendidas libremente en la leche, o a las listerias que simplemente son fagocitadas por macrófagos pero no crecen dentro de ellos (49).

En otros estudios de pasteurización, Donker-Voet (42), utilizó leche que provenía de vacas infectadas naturalmente con *L. monocytogenes*; para disponer de suficiente leche, ésta fue almacenada en una hielera a 4° por una semana. Mantener la leche bajo esas condiciones resultó en una degradación de los leucocitos polimorfonucleares (LPMN) y permitió la liberación de las listerias intracelulares a la leche. De esta manera se incrementó la sensibilidad térmica del organismo. Esto puede explicar parcialmente porqué *Listeria* no sobrevivió al tratamiento térmico de 66.4° o más por 15 s. (49). Aunque *L. monocytogenes* fue aislada de leche calentada a 72.2° por 16.4 s., el organismo no fue detectado en muestras de leche calentadas a 76.4 o 77.8° por 15.4 s. La experiencia anterior sugiere que los tratamientos térmicos prolongados pueden ser suficientes para eliminar listerias viables en la leche (49). En la actualidad, se reconoce que la leche pasteurizada protegida de contaminaciones ulteriores, ofrece amplios márgenes de seguridad a la población general (30, 31).

La exposición a temperaturas por arriba de los límites del crecimiento celular, ocasiona una pérdida en la viabilidad bacteriana. Cuando una bacteria se aparta ligeramente por un corto período de sus límites normales de temperatura de crecimiento, se activan mecanismos de protección contra el efecto letal de los cambios hacia temperaturas más altas (33). Está bien documentado que las bacterias en la fase estacionaria de crecimiento son generalmente más resistentes que las bacterias en la fase logarítmica (49).

La termotolerancia de *L. monocytogenes* puede ser inducida por una exposición subletal al calor. Por ejemplo, después de un choque térmico a 42-48°, el valor $D_{57.8^\circ}$ se incrementa de 1 a 3 minutos. Si la bacteria se expone previamente 5 min. a 35°, el valor $D_{57.8^\circ}$ es de 9.9 minutos; cuando se mantiene el mismo tiempo a 48°, ese valor es de 11.8 minutos (33). Carpenter y Harrison (35) demostraron la sobrevivencia de *L. monocytogenes* en pechugas de pollo calentadas con calor húmedo a temperatura interna de 78.9° independientemente del número inicial (de 300 a casi 50 000).

BAJA TEMPERATURA.

El carácter psicrótrofo de la *L. monocytogenes* se encuentra bien establecido. Es capaz de duplicar el número cada 1.5 días cuando se refrigera a 4° (90, 55). Sostiene el crecimiento en salmón ahumado almacenado a 4° (70). Ha sido postulado que en dos brotes de listeriosis (58, 114), el almacenamiento en refrigeración pudo haber permitido que el microorganismo se multiplicara en el alimento antes de su consumo (138). Aunque el crecimiento de *L. monocytogenes* está bien caracterizado a 4° (45, 55, 70, 90), poco se sabe acerca de la habilidad de las cepas para crecer a más bajas temperaturas (138). Walker y col. (138) en 1990, reportan que la mínima temperatura de crecimiento para tres cepas de *L. monocytogenes* en caldo de pollo, se encontraba entre -0.1 y -0.4°.

Golden y col. (67) en 1988, inocularon leche, helado, queso y col con *L. monocytogenes*, los cuales se congelaron y almacenaron durante 14 días a 18°. El microorganismo no se afectó marcadamente por efecto de la congelación. Los alimentos generalmente protegen más a *L. monocytogenes* durante la congelación y almacenamiento en congelación que los medios de laboratorio o soluciones (50).

1. Baja temperatura y procesamiento.

Como comúnmente *L. monocytogenes* se encuentra en el ambiente de las plantas procesadoras (40), es posible que el microorganismo pueda adaptarse a crecer a bajas temperaturas antes de contaminar a los alimentos (138). Consecuentemente, los márgenes de seguridad para el almacenamiento de los alimentos a bajas temperaturas pueden ser considerablemente más cortos que los indicados, cuando no se considera el potencial del germen para adaptarse a crecer a dichas temperaturas (138).

Los resultados de Walker y col. (138) indican que las temperaturas utilizadas para el almacenamiento de los alimentos en refrigeración (0 a 10°), no son suficientes para prevenir el crecimiento de *L. monocytogenes*. En estas condiciones, sin embargo, se va a extender el tiempo necesario para que se alcance una concentración significativa de microorganismos al disminuirse la tasa de crecimiento. La refrigeración junto con otros factores (sal, acidez), puede retardar notoriamente, o prevenir, el crecimiento de *L. monocytogenes* (39).

2. Efecto de las bajas temperaturas sobre los microorganismos.

En condiciones de congelación la actividad microbiana es virtualmente nula. La revisión de El-Kest y Marth (50), proporciona interesantes comentarios al proceso de congelación de los alimentos y su efecto en la viabilidad de los microorganismos. Algunos microorganismos son muy frágiles y pierden rápidamente su vitalidad; otros

se inactivan progresivamente. En realidad, la muerte microbiana puede presentarse en el acto de congelación, durante el almacenamiento en tal condición o durante la descongelación. La velocidad del proceso de congelación tiene un efecto marcado en la sobrevivencia.

Cuando se disminuye la temperatura de los microorganismos rápidamente, algunos sufren daño por el choque térmico. Un proceso lento de congelación es más letal que uno que se aplica rápidamente. Las células congeladas pueden ser dañadas mecánicamente por los cristales intra y extracelulares. Situación similar se presenta en los alimentos. La congelación lenta provoca rompimiento de la integridad de los tejidos y reblandecimiento. Mediante la congelación rápida se preserva mejor el alimento, pero también los microorganismos que contiene. Con el congelamiento, el agua se separa, y entonces hay una afectación de la lipoproteína de la membrana celular. La congelación es un proceso de importancia en los alimentos porque minimiza su deterioro y puede reducir la concentración de patógenos que pudieran encontrarse.

Algunas sustancias crioprotectoras se adicionan a los alimentos congelados para reducir la inactivación de microorganismos útiles. Ciertos componentes de los alimentos tienen actividad crioprotectora.

Muchas de las reacciones catalizadas enzimáticamente que ocurren en las células requieren una temperatura óptima para que sean efectivas. El choque térmico (choque frío) es un ejemplo clásico del daño celular resultante de una disminución de la temperatura. El choque por frío de las bacterias ocurre en condiciones especiales, como cuando se aplica un rápido enfriamiento, y cuando las células se encuentran en fase logarítmica.

El enfriamiento de las células bacterianas se ve afectado por la naturaleza del sistema celular. Diferencias en la actividad de agua, sitios de nucleación, viscosidad, permeabilidad de la membrana y otros factores alteran significativamente la nucleación y el crecimiento de los cristales de hielo en las células. Una baja velocidad de

enfriamiento provoca desarrollo de cristales de hielo de gran tamaño fuera de la célula, casi de su misma dimensión. El fluido extracelular comienza a ejercer una presión hipertónica dando lugar a la salida de agua de la célula, y deshidratación o concentración de sólidos en el interior.

El congelamiento intracelular ocurre espontáneamente entre -5° y -13° , cuando el medio externo ya está congelado, y a temperaturas más bajas cuando el exterior no contiene hielo. La temperatura de congelación aumenta marcadamente en ausencia de un agente de nucleación. Estos agentes son sustancias cristalinas relativamente insolubles en agua (cristalográficamente son similares al hielo). La presencia de solutos causa la disminución del punto de congelación y la nucleación puede estar ausente. Se ha sugerido que el hielo intracelular es el agente letal para las bacterias.

Cuando en un alimento congelado se eleva la temperatura, los cristales de hielo crecen y entonces las células resultan afectadas físicamente. Se ha observado que los microorganismos dañados por congelación pierden su capacidad de dividirse y de crecer en medios selectivos. El estrés bacteriano ocasionado por la congelación se manifiesta en un incremento en la fase lag, y en un decremento en el tiempo de generación, y de la tasa de crecimiento.

Aunque algunos microorganismos pueden morir durante la congelación, podrían simplemente exhibir una reducción en la actividad metabólica. Así, muchos pueden permanecer viables por largos períodos de almacenamiento en frío. Lo deseable es que la cuenta inicial de los productos crudos se encuentre en niveles bajos antes de la congelación (94).

pH

Entre los factores intrínsecos importantes que influyen en la microflora que puede desarrollar en los alimentos de origen vegetal, se incluyen el pH y la actividad de agua. La actividad de agua de las frutas y verduras frescas es suficientemente alta para sostener el crecimiento de la mayoría de las bacterias y hongos. De igual manera, a excepción de los jitomates, el pH de la mayoría de las verduras se encuentra entre 5.0

y 6.0, valores que no son inhibitorios del crecimiento de la mayoría de los microorganismos. El brócoli, verdura de interés en este trabajo, se encuentra en esta situación; tiene un pH de 5.2-6.0 (28). En otros alimentos como los quesos fermentados la actividad del germen es variable. Se ha observado una correlación entre el crecimiento de *Listeria* a valores de pH >5.5 y la ausencia de cultivos iniciadores durante la manufactura de queso (66). Sobrevive largos períodos en queso brick, cottage o Trappist; por el contrario el queso tipo Dutch y el Parmesano no favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes* (107).

GERMICIDAS

La inactivación del germen en las plantas procesadoras de alimentos es un requisito básico para controlarlo e impedir su acceso al producto terminado. La información disponible muestra que *L. monocytogenes* no exhibe una excepcional resistencia a los germicidas ordinarios. El monitoreo de la limpieza microbiológica de las superficies en las plantas procesadoras de frutas y verduras es de especial relevancia en la obtención de productos de alta calidad. La mayor parte de las técnicas disponibles continúa siendo lenta, de manera que no es posible detener la producción mientras se decide sobre la idoneidad sanitaria del equipo para iniciar o continuar los procesos. Los monitoreos basados en la bioluminiscencia constituyen una perspectiva que está adquiriendo notoriedad (6, 10, 104, 117).

1. Hipocloritos.

Los hipocloritos son desinfectantes activos contra un amplio espectro de organismos; no muestran toxicidad al humano a bajas concentraciones. Debido a que son de los más económicos, se emplean ampliamente en la industria de los alimentos. La principal desventaja es que la humedad, el calor, la luz, y sobre todo la presencia de

materia orgánica, incrementan la tasa de pérdida de cloro libre (142). La actividad germicida del cloro generalmente ha sido atribuida al ácido hipocloroso (HOCl), el cual es generado en soluciones acuosas de hipoclorito de sodio y otros compuestos que contengan cloro. Dado que el HOCl puede disociarse en ion hipoclorito (OCl^-) y en ion hidrógeno (H^+), dependiendo del pH de la solución, la carga eléctrica neutra sugiere que el HOCl puede penetrar más fácilmente la pared celular, que el ion OCl^- . Después de difundirse al interior de la célula, el HOCl inactiva al organismo a través de la inducción de ciertas especies de oxígeno tóxico, o combinándose con proteínas, lo cual puede inhibir las reacciones enzimáticas y alterar la permeabilidad de la membrana celular (109).

La edad del cultivo es un factor importante en la inactivación de *L. monocytogenes* por cloro; por ejemplo un cultivo de 24 horas disminuye 2.88 órdenes de magnitud después de 10 minutos de exposición al germicida, mientras que un cultivo de 48 horas con el mismo tiempo de exposición disminuye 4.27. Es decir, cultivos jóvenes se muestran más resistentes al cloro. La razón puede estar relacionada con las diferencias en la estructura de la pared celular. La pared celular de una célula joven consiste aparentemente de 3 capas; mientras que en células viejas, estas capas tienen una apariencia difusa. Estas diferencias estructurales pueden tener un efecto en la cantidad de HOCl que penetra a la célula y la velocidad con la que esto ocurre (51).

Se afirma que el cloro actúa rápidamente contra los patógenos, pero algunos estudios muestran que la efectividad de una solución de hipoclorito de sodio no solamente es afectada por el tiempo de exposición y la concentración del cloro libre, sino por otros factores como la temperatura, el pH, el tipo de cepa, la presencia de materia orgánica y en el caso de la desinfección de verduras, del tipo de ésta (18, 51, 62, 142). Por ejemplo, Garg et al. (63) en 1990 reportan que la inmersión de las verduras en agua con 300 mg/L de cloro libre, disminuye 3 log de la cuenta total microbiana de lechuga, pero no tiene efecto en zanahoria o col roja (63). Para la lechuga, el efecto bactericida sobre *L. monocytogenes* fue más alto a 22° que a 4°; sin

embargo, para la col no hay diferencia a las dos temperaturas (142). Brackett (26) en 1987 observó que una solución de cloro (200 mg/L) no era completamente efectiva para desinfectar verduras. También se ha ensayado el rociado con soluciones de hipoclorito para reducir, aunque con escaso éxito, las cuentas bacterianas en canales de cerdos (134).

De acuerdo con algunos reportes, la inmersión en cloro parece efectiva para el control de contaminación bacteriana de frutas y verduras (87). Pero generalmente se acepta que las verduras no se desinfectan efectivamente con tratamientos a base de cloro, independientemente de la concentración y el tiempo de exposición (94). Por ejemplo, 100 mg/L de hipoclorito no fueron suficientes para eliminar *L. monocytogenes* en ensaladas de verduras listas para consumo (62). Otros autores estiman que los tratamientos de enjuague clorado en frío, pueden tener mayor efecto si los niveles de cloro residual se controlan adecuadamente (63).

Aunque *L. monocytogenes* parece sensible a bajas concentraciones de cloro (50 mg/L), se debe ser prudente para usar algo más que la concentración mínima en situaciones prácticas. Una razón es que, como se ha mencionado, el cloro disponible es afectado por el pH, la presencia de materia orgánica, la dureza del agua y la temperatura (26). Por tanto, el cloro activo puede estar en menor cantidad que la que se asume. También debe tenerse presente que el uso de germicidas sobre superficies secas de acero inoxidable, es menos efectivo que en solución (26). Beuchat y Brackett (21) reportaron en 1990 que el tratamiento con cloro, almacenamiento en atmósfera modificada (3% O₂, 97% N₂) y el rebanado no influyen sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en lechuga. Observaron además un ligero incremento del germen en la lechuga empacada después de 3 días de almacenamiento a 10°; a los 10 días la población alcanzó aproximadamente 10⁸ - 10⁹ ufc/g.

2. Otros germicidas.

Además de los compuestos clorados, otros germicidas químicos (yodóforos, sales cuaternarias de amonio, y desinfectantes ácidos) se utilizan para controlar las contaminaciones microbianas en las plantas procesadoras de alimentos (109). Se acepta en general, que un germicida es efectivo, si reduce la población microbiana 99.999% (5 log) en 30 seg. de exposición (26). Las soluciones de sales cuaternarias de amonio que contienen 100-200 mg/L son efectivas contra *L. monocytogenes* cuando se evalúa en superficies no porosas (87). Mustapha y Liewen (95) reportaron que las soluciones acuosas que contenían 100-800 mg/L de un compuesto cuaternario de amonio (como el cloruro de n-alquil dimetil diclorobenzil amonio) mostraban una mayor actividad listericida que soluciones similares de hipoclorito de sodio.

Las soluciones de yodóforos también resultan ser efectivas contra *L. monocytogenes*. A concentraciones de 12.5 y 25 mg/L de yodo titulable, la cuenta bacteriana disminuyó 5 log en 30 seg. El pH del germicida fue de 6.1 y 3.9 respectivamente; como se sabe, el yodo es más efectivo a pH ácido (87).

El Citricidin^{MR} es un compuesto bactericida, fungicida, antiviral y antiparasitario de amplio espectro sumamente potente y efectivo (38). Se fabrica a partir de las semillas y la pulpa de toronja. El producto final es una combinación de elementos naturales incluyendo bioflavonoides, aminoácidos, ácidos grasos, sacáridos, tocoferoles, ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico (38). La actividad antimicrobiana del Citricidin^{MR} se lleva a cabo en la membrana citoplásmica donde se previene la captura de aminoácidos, la desorganización de la membrana citoplásmica y la transaminación de contenidos celulares de bajo peso molecular (38). Es decir, actúa por contacto a través del sistema de citoplasmosis, destruyendo a los microorganismos patógenos al romper su pared celular (38). Es interesante señalar que el Citricidin^{MR} trabaja en forma diferente a los desinfectantes tradicionales en la forma siguiente (38):

un bajo poder de choque en los primeros minutos de aplicación; elevado poder residual microbicida; es soluble en agua, alcohol y solventes orgánicos; en solución a 25° tiene un pH de 2.3 - 2.5 (38). El fabricante reporta además, que la concentración mínima inhibitoria para *L. monocytogenes* es de 20 mg/L (38).

SOBREVIVENCIA EN SUPERFICIES INERTES.

L. monocytogenes es capaz de sobrevivir por más de 21 años en medios de laboratorio refrigerados, 10 días en agua mantenida a 22°, y 6, 3, y 1 días en agua destilada almacenada a 22, 30 y 40°, respectivamente (109). Es también relativamente resistente a la desecación. Estas observaciones han permitido aceptar la posibilidad de que *L. monocytogenes* sobreviva en varios tipos de materiales comunes en el procesamiento de los alimentos (109). Recientemente brotes de listeriosis debidos a productos lácteos contaminados han hecho pensar a los procesadores en la posibilidad de un cierto grado de resistencia del organismo a las etapas de los sistemas de higienización (95).

Las prácticas de higienización adecuadas son una importante medida que ayuda a reducir la contaminación en los alimentos procesados. Se han realizado numerosos estudios para probar la efectividad de varios limpiadores y germicidas para eliminar los microorganismos que pueden estar albergados en el piso o en residuos de alimentos sobre las superficies de acero inoxidable del equipo de procesamiento (95).

Stedman (127) mostró una mayor demanda de germicidas para eliminar bacterias en superficies porosas, que en las no porosas. El germen puede adherirse a superficies de acero inoxidable entre límites de temperatura de 10 a 35° y entre valores de pH de 5 y 8 (73, 74). Jeong y Frank (80) observaron que *L. monocytogenes* desarrolla a 10° sobre películas en acero inoxidable aún en presencia de flora competitiva. La formación de biopelículas es un fenómeno generalizado en la naturaleza y en el ambiente de las plantas procesadoras de alimentos. Los

microorganismos adheridos constituyen una fuente de contaminación importante en esas industrias debido a su mayor resistencia a diversos agentes antimicrobianos (95).

Mustapha y Liewen (95) reportaron en 1989 que, *in vitro*, 100 mg/L de hipoclorito de sodio son suficientes para reducir 4 log el número de células. Sin embargo, sobre superficies de acero inoxidable, parece haber cierto grado de resistencia a los germicidas.

Se recomienda la aplicación de 200 mg/L de hipoclorito de sodio por lo menos 2 minutos para higienizar superficies no porosas, mientras que se requieren 800 mg/L para superficies porosas; las sales cuaternarias de amonio en cantidades de 50 mg/L durante 1 minuto para ambos tipos de superficies; esto confirma el alto grado de susceptibilidad de las bacterias gram-positivas a las sales cuaternarias de amonio (95).

L. monocytogenes Scott A puede adherirse a diferentes superficies como acero inoxidable, vidrio y polipropileno, a temperaturas de 20 y 4° después de tiempos cortos de contacto, 20 min. y 1h (4).

La adhesión de células bacterianas en superficies sólidas puede conducir a la proliferación y subsecuente colonización de dichas superficies bajo condiciones favorables (4). Mafu y col. (4) reportaron que la adhesión de *L. monocytogenes* a los materiales inertes antes mencionados no muestra relación con la prolongación del tiempo de contacto, pero al examinar por microscopía electrónica de barrido la presencia de materiales extracelulares alrededor de las células adheridas a superficies como vidrio y polipropileno, se observó que estaban presentes después de 1 hora pero no a los 20 min. de contacto (4). Se ha reportado (124) que algunas cepas de *L. monocytogenes* poseen un polisacárido capsular que puede relacionarse con la virulencia.

Una inadecuada pre-limpieza, puede permitir que los residuos que no sean detectados a simple vista, disminuyan la efectividad del germicida. Un bajo nivel de células sobrevivientes presentes en el equipo después de la higienización pueden fácilmente desarrollar en la materia orgánica presente (95). La microscopía electrónica

de barrido indica que *L. monocytogenes* probablemente se adhiere a las superficies de acero inoxidable, al producir fibrillas (al parecer similares a las producidas por *Pseudomona*) de composición aún desconocida, las cuáles muestran cierta susceptibilidad a la acción de los germicidas (95).

3.2 FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO.

ATMÓSFERAS MODIFICADAS

En los países desarrollados se observa cada vez más una inclinación por la adquisición de verduras mínimamente procesadas. A diferencia de las precocidas y congeladas, aquellas no han recibido un tratamiento térmico terminal. El almacenamiento en atmósferas controladas, una técnica para mantener la calidad deseable en los vegetales, involucra alteraciones en la atmósfera que está en contacto con el producto manteniéndose así a través del almacenamiento. Por otra parte, el almacenamiento en atmósferas controladas para vegetales generalmente consiste en el uso de un decremento en la concentración de O₂ y un incremento en la concentración de CO₂ comparado con las concentraciones en el aire. Generalmente durante este tipo de almacenamiento también se reduce la temperatura. Dichas condiciones se traducen en una disminución en la tasa de respiración de los tejidos vegetales vivos, y extiende la vida del alimento considerado como de alta calidad (16). La protección del alimento requiere de un empaque, uso de baja temperatura y en algunos casos de atmósferas modificadas. Estos sistemas plantean un problema de riesgo a la salud debido a que el desarrollo de algunos microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, puede verse favorecido por la baja temperatura, y porque el empleo de la atmósfera modificada, si bien retrasa la actividad de bacterias deterioradoras, de manera indirecta promueve el desarrollo de ese patógeno.

García-Gimeno y col. (62) en 1996 determinaron el nivel de contaminación de *L. monocytogenes* en ensalada de verduras listas para su consumo (lechuga, zanahoria y col roja obtenidas de una planta procesadora). *L. monocytogenes* sobrevivió bien en las condiciones de atmósfera modificada de la ensalada, pero no creció a niveles detectables. Estos hallazgos coinciden con otros estudios en los cuáles una atmósfera modificada tiene un pequeño o nulo efecto sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* (15, 16). En general el aspecto y color de la ensalada fue aceptable para su consumo. Esto significa que existe un alto riesgo de que *L. monocytogenes* crezca, dado que la atmósfera modificada propicia una larga vida de anaquel, de lo que puede sacar ventaja para crecer. El pH de las muestra permaneció en un valor cercano a 6 lo cuál no fue un factor limitante en el crecimiento de *L. monocytogenes* (62).

Berrang y col. (17) recientemente investigaron el comportamiento de *L. monocytogenes* en muestras inoculadas (10^3 - 10^5 ufc/g) de espárragos, brócoli y coliflor durante el almacenamiento en refrigeración en jarras de vidrio conteniendo: (a) 15% de O₂ : 6% de CO₂ : 79% de N₂, (b) 11% de O₂ : 10% de CO₂ : 79% de N₂, (c) 18% de O₂ : 3% de CO₂ : 79% de N₂ y (d) aire. *Listeria monocytogenes* se comportó similarmente en cada verdura cuando el producto se almacenó en atmósfera modificada o aire. Las tres verduras soportaron el crecimiento de *L. monocytogenes* a 15°, alcanzando poblaciones de $\sim 10^6$ a cerca de 10^9 /g después de 6-10 días de iniciada la incubación (en estas circunstancias el producto era inadecuado para el consumo humano) (15, 17).

4. INCIDENCIA Y COMPORTAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* EN PRODUCTOS VEGETALES

El papel de los vegetales, como vehículo de infección por *L. monocytogenes* al hombre, merece consideración, ya que, por varios años, muchos investigadores han destacado la presencia de *L. monocytogenes* en rumiantes y en la pastura. Es difícil evaluar el papel de la tierra, ya que en todos los muestreos parte del material de la planta fue recuperado de la tierra (140).

Dentro de su amplia distribución en la naturaleza sobresale la incidencia en los suelos y en aguas residuales con altos contenidos de materia orgánica, por lo que puede considerarse un microorganismo saprófito (109). En un estudio realizado en 1968, se analizaron muestras de vegetales de 12 granjas. En 7 de ellas se aislaron e identificaron los serovares de *L. monocytogenes* 4a, 4b, 4d, 1a y 1b. El que se encontró en menor proporción de muestras de vegetales y forraje, fue el 4a, lo cuál llevó (extrañamente) a los autores a sospechar que el serotipo 4a es peculiar de la "vida libre" o saprófita, más que asociado a una existencia parasitaria (140).

Se le ha aislado del 9.7% de campos de maíz, 13.3% de campos de cereales, 44% de campos no cultivados, y de 21.3% de bosques; los porcentos son similares en las plantas y la superficie del suelo donde desarrollan (109). Debido a que la mayoría de las verduras crecen cerca o debajo de la superficie de la tierra, muestran una microflora heterogénea, en la que predominan los microorganismos del suelo (94).

La mayoría de las verduras analizadas en el estudio de Garg y col. (63) contenían números significantes de bacterias psicrótrofas; de hecho, algunas veces las cuentas de mesófilos y psicrótrofos eran comparables. Desafortunadamente la población inicial de psicrótrofos afecta la vida de anaquel de ese tipo de alimentos refrigerados (63). En otro estudio, *Listeria* spp. fue aislada de papa, rábano, col, pepino, hongos (champiñones), lechuga, pero no de brócoli, zanahoria, coliflor o tomates. Por supuesto, esto no quiere decir que los lotes examinados no estuvieran

contaminados con *L. monocytogenes* (72). Sólo la papa y el rábano mostraron cantidades significantes de contaminación por *L. monocytogenes*.

Es posible que el brócoli, la coliflor y los tomates, muestren menor contaminación debido a que tienen menos contacto con la tierra donde crecen, que los tubérculos como la papa (72). Farber (55) en 1989 no aisló al patógeno de lechuga, apio, rábanos ni de jitomates (175). A diferencia de las ensaladas de verduras bajas en acidez, el jitomate y zanahoria no son buen substrato para *Listeria* (20, 22, 23, 62, 96, 97). Un estudio sugiere que algunos componentes de la zanahoria pueden ser tóxicos a *Listeria* spp. Cuando se contaminaron zanahorias con una suspensión de *L. monocytogenes*, la población bacteriana se redujo inmediatamente. Este decremento no se observó con otro tipo de verduras (20).

En el estudio de García-Gimeno y col. (62) se aisló *L. monocytogenes* de 21 muestras (30%) de un total de 70. Este porcentaje fue alto en comparación con los de otros investigadores; Sizmur y Walker (121) en 1988 reportan una contaminación del 7% en muestras de verduras y Steinbruegge y col. (128), también en 1988, 9% en cabezas de lechuga. Finalmente, Heisick y col. (72) en 1989 encontraron 1% de contaminación por *L. monocytogenes* en col cruda. Otros autores reportan no haber encontrado *L. monocytogenes* en verduras crudas (101). La distribución de gérmenes patógenos que no son abundantes en productos como la lechuga, en la que pueden localizarse muchos microambientes discretos, contribuye a explicar parcialmente las diferencias. En el brote donde la col fue el vehículo, se aisló la *L. monocytogenes* a partir de la ensalada refrigerada. El mismo serotipo (4b) fue aislado de la sangre de los pacientes. Es posible que la contaminación hubiera tenido su origen en la col proveniente de una granja afectada por listeriosis ovina (101).

Conner y col. (39) encontraron que *L. monocytogenes* puede desarrollar en col refrigerada y en su jugo, dentro de amplios límites de pH con una concentración NaCl superior a 5%. En el jugo no clarificado, la población de *L. monocytogenes* Scott A se incrementó de 10^4 a 10^9 ufc/mL en 8 días a 30°. A partir de entonces el número

disminuyó rápidamente, y ya no se detectaron células viables a los 20 días. En jugo de col que contenía 0.25 o 0.5% de NaCl la población se incrementó a los 8 días y después decayó gradualmente. Sin embargo, con 1% de NaCl se presentó un decremento inicial a los 3 días, seguido por un incremento gradual hasta $>10^5$ ufc/mL a los 15 días (39). Los líquidos que se liberan de las verduras durante el transporte, manejo o cortado al prepararlas, constituyen una fuente de nutrientes que podrían estimular el desarrollo microbiano (25, 128). Todos estos hechos sugieren claramente que las verduras como la col pueden ser un vector para la transmisión de listeriosis humana (39).

Petran y col. (101) en 1988 analizaron lechuga, brócoli, col, zanahoria y coliflor congeladas obtenidas de supermercados; en ninguna de las muestras presentaba niveles detectables de *L. monocytogenes*. El brócoli picado precocido y congelado muestra cuentas altas de mesófilos aerobios (10^6 /g), mientras que los chícharos, ejotes y hojas de espinacas también congeladas, muestran cifras más bajas (126). *L. monocytogenes* se aisló del 30% de ensaladas de verduras mixtas preparadas a base de lechuga, zanahoria, y col roja. Todas las cepas fueron hemolíticas y pertenecían a los serotipos 3a y 3b. Sismur y Walker (121) aislaron el tipo 4b a partir de ensaladas listas para consumir; el mismo tipo fue detectado por Ho y col. (75) en el brote de listeriosis ocurrido en Massachusetts. Steinbruegge y col. (128) identificaron el serotipo 1 en ensalada de lechuga y Heisick y col. (72) al serotipo 1a a partir de col. En realidad, el 30% es un porcentaje muy alto, considerando que debe ser reducido por el lavado y el tratamiento con cloro, si bien este microorganismo no muestra una especial resistencia (51, 87).

5. REGULACIÓN

Por lo general, tanto en plantas como en servicios de alimentos en nuestro país no se concede importancia relevante a la inocuidad de los productos que procesan o que preparan. Esta actitud es en parte un determinante en la presentación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), principalmente las de etiología microbiana (11, 12, 13, 131). En los países en vías de desarrollo se acentúa el problema; no es de extrañar por ello, que algunos cálculos estimen la frecuencia de ETAs en más de 160 millones por año en nuestro país (56). Una consecuencia de esa desatención son las pérdidas económicas que resienten tanto aquellos que procesan alimentos, como las personas directamente afectadas. El costo de los brotes no se limita a los gastos médicos; hay que considerar la pérdidas económicas que implican el cierre de plantas procesadoras o el rechazo de grandes volúmenes de producto (85, 132, 133). Como es de esperar, el costo de las ETAs difiere según el tipo de enfermedad y otros factores, como el sitio en el cual el alimento adquirió peligrosidad (restaurante, comercio, hogar, planta procesadora, cocina de hospital, asilo, guardería, escuela, cocina del aire), el número de personas afectadas, su gravedad (incluidas las secuelas), y los fallecimientos (111).

Actualmente se advierte una tendencia por la adquisición de alimentos listos para ser consumidos, a expensas de los productos procesados, sobre todo de las verduras enlatadas (63). Entre este tipo de alimentos, se encuentran las verduras precocidas y congeladas. El consumidor percibe a las verduras frescas más nutritivas que la contraparte procesada. El segmento que más rápidamente ha crecido es el de los cortes en fresco, productos como barras de zanahoria y apio, lechuga picada, y otros constituyentes de ensaladas de hojas, floretes de coliflor y brócoli, y cebolla rebanada y picada. Estos productos son populares tanto entre los consumidores como en instituciones en las que se preparan y sirven alimentos. A ello contribuye un menor tiempo y esfuerzo para su preparación, así como menor carga de desperdicios (63). Por

ejemplo, las ensaladas de verduras mínimamente procesadas, son verduras lavadas, peladas (si es necesario), cortadas y empacadas en películas semi-permeables, que ya se encuentran listas para su consumo. Muestran una vida de anaquel de 7-10 días a 4° (62).

Los países importadores han establecido una norma para *L. monocytogenes* de 0 en porciones de 25 g en los alimentos listos para su consumo (84). El objetivo de tal exigencia es la protección de la salud del consumidor. La norma se fundamenta en la severidad del padecimiento que se ha registrado en algunos brotes, y a la falta de información segura sobre la dosis mínima infectante del microorganismo. Hasta el momento permanece oscuro cuál es la dosis necesaria para establecer la manifestación de la infección; aunque puede anticiparse que la dosis puede variar de individuo a individuo (77). Con la experiencia actualmente disponible no es fácil relacionar el número de casos de listeriosis con la frecuencia con la cual el germen es consumido; hay que considerar además, la existencia de cepas virulentas y avirulentas. Un hecho de especial significado en relación con la normatividad anotada, es la amplia distribución del germen en el medio ambiente, que facilita la contaminación de los alimentos.

El número de células de *Listeria* presentes en los alimentos suele ser muy bajo (generalmente menos de 10^2 /g) (24, 89, 103). En muchos países y en el plano internacional existen comités involucrados en la elaboración de normas y lineamientos para evaluar el riesgo a la salud asociado al consumo de alimentos (77). Entre un buen número de ellos, la exigencia de la norma de 0 *L. monocytogenes* /25 g de alimento está siendo seriamente cuestionada (54). Por ejemplo, un grupo alemán está a favor de la tolerancia de un cierto número de bacterias en algunos alimentos (77). En otros países, en especial Estados Unidos, se aplican rechazos en función de la norma mencionada. El problema se complica un tanto debido a que *Listeria* spp. puede multiplicarse en el alimento durante el almacenamiento en el hogar, aún a bajas temperaturas.

Después del brote por queso ocurrido en California (86), la FDA inició un intensivo esfuerzo con la industria de productos lácteos para identificar la incidencia de *L. monocytogenes* en las fábricas. Más de 1 000 fueron investigadas, retirándose el producto en el que 3% se encontraron contaminada. Otra investigación reveló que muchas de las muestras de quesos blandos importados contenían *Listeria*. Como resultado, la FDA incrementó el muestreo de los importadores, con ensayos positivos, y requirió que todos los embarques subsecuentes se encontraran “libres de *Listeria*”. La respuesta de la FDA para la industria láctea fue generalmente enfocada a la llamada “cero tolerancia” para *L. monocytogenes*, especialmente para los alimentos comerciales que no tienen un tratamiento térmico previo a su consumo (84).

En contraste con estos esfuerzos, el USDA adoptó un programa general de “reducción de patógenos” aplicado a todos aquellos transmisibles por alimentos. Especial énfasis se aplicó a promover la investigación entre los alimentos refrigerados y de métodos rápidos de laboratorio para detectar a esos microorganismos, la educación en los consumidores y la aplicación del sistema de análisis de riesgos y puntos de control crítico (SARPCC) (84).

Una de las acciones más importantes de la USDA fue la recomendación de un “sistema total de seguridad” en los alimentos, que debiera cubrir “desde la granja hasta la mesa del consumidor”, como el de ARPCC.

No obstante la rigidez del gobierno de Estados Unidos, la medida de “cero tolerancia” para los alimentos listos para su consumo, adoptado primero por la FDA y luego por la USDA, no puede considerarse como una garantía para evitar brotes de listeriosis. Sería necesario, sobre esa base, muestrear el 100% del alimento para confirmar que se encuentra absolutamente libre de listeria (84). Aún cuando *L. monocytogenes* se encuentra comúnmente en los alimentos, no constituye necesariamente un riesgo inminente para la salud, ya que no todas las cepas de *L. monocytogenes* son patógenas. Se ha planteado de manera muy razonable, que como en la realidad los niveles de *L. monocytogenes* son mayores a “cero”, que las cepas

pueden ser patógenas o no y que no se han reportado brotes desde 1985, la política de “cero tolerancia” para los alimentos listos para su consumo podría ser reconsiderada (84, 115).

Como alternativa para el objetivo de aseguramiento de la inocuidad de los alimentos en general, y en particular para *L. monocytogenes*, se presentan ahora nuevos enfoques (92). Son necesarios:

1. Un rígido programa de higienización del medio ambiente acompañado de higiene personal, separación de la áreas de producto crudo y las áreas de proceso de los productos listos para su consumo y procedimientos de limpieza e higienización que hayan sido monitoreados para proveer eficacia.
2. La implementación de un programa de Análisis de Riesgos y Puntos de Control Crítico (ARPCC) que incluye la calidad e inocuidad de los ingredientes, y el control del proceso sobre una base continúa y de las condiciones bajo las cuáles el producto es manipulado y almacenado.
3. El adiestramiento del personal y la supervisión de las operaciones sanitarias.

Mientras tanto, para la satisfacción de la norma vigente es fundamental por una parte, un alto nivel técnico administrativo en los programas de aseguramiento de la inocuidad, y por otra, amplia información sobre la incidencia y comportamiento del microorganismo bajo el efecto de los tratamientos a los que se sujete el producto, desde su desarrollo en los campos de cultivo, hasta el tiempo de analizar el producto procesado. En principio, los importadores demandan de las plantas procesadoras, la implementación del sistema conocido de Análisis de Riesgos y Puntos de Control Crítico. Desafortunadamente en México se presentan limitaciones importantes para este propósito (56).

6. PLANTAS PROCESADORAS

Las crucíferas se consideran las hortalizas de mayor importancia socioeconómica en la región del Bajío, si se atiende a la superficie sembrada, los ingresos que aportan y las fuentes de trabajo que se generan (3). En la actualidad se siembran de 18 a 20 mil hectáreas de brócoli y coliflor al año en los estados de Guanajuato y Querétaro. El producto que se cosecha de las crucíferas se destina principalmente al mercado de exportación, lo que representa una significativa fuente de divisas, y un incentivo para los productores (3). Los cultivos de brócoli y coliflor ocupan gran cantidad de mano de obra, en forma directa en las labores propias del cultivo en el campo, e indirecta por el personal que se ocupa durante el proceso, empaque y transporte. En el caso particular del brócoli y coliflor se estima que se utilizan alrededor de 110 jornales de trabajo por hectárea al año (3).

En el plano de la microbiología de estos productos, hay que anotar que los microorganismos pueden ingresar a partir de la tierra, agua, aire, maquinaria y durante las operaciones humanas involucradas en la cosecha. Eventualmente penetran el tejido del vegetal a través de los estomas, o por heridas en la planta como cortadas y magulladuras (93). En la fábrica, los productos crudos vienen a ser una fuente de contaminación para el medio ambiente. El flujo de los productos debe ser diseñado para separar los alimentos libres de *Listeria* de las fuentes potenciales de contaminación controlando el paso del producto a través de la planta a manera que se mantenga independiente "lo limpio de lo sucio". El personal también debe ser considerado "limpio y sucio", dependiendo de la exposición a las fuentes potenciales de contaminación, y debe tener restringidos sus movimientos dentro de la planta. Es común observar contaminación cruzada entre los productos crudos y terminados, debido principalmente a manipuladores, equipo, agua, aire, o a la inadecuada ubicación de la cañería dentro de la planta (90). De esta manera, el régimen de higienización de la planta entera debe estar bajo un escrutinio y evaluación constante. Aún con las estrictas prácticas de higienización, todos los puntos del proceso que se

encuentren abiertos deben ser considerados fuentes potenciales de contaminación, y el escrutinio y cuidado, incluyendo los análisis microbiológicos, deben ser parte de las prácticas de control de calidad (90). El equipo que pica y rebana los alimentos generalmente es difícil de limpiar. El crecimiento microbiano ocurre en los residuos que se acumulan en las superficies internas del equipo y el subsecuente contacto con los vegetales resulta en una contaminación significativa (72).

Las fuentes de contaminación microbiana incluyen suelo, agua, abono de animales, vegetación en descomposición y efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (135).

En la región del Bajío existen 7 plantas procesadoras de verduras precocidas y congeladas, la mayoría exportadoras. Para cumplir con la norma mencionada, estas plantas deben aplicar sistemas modernos como el del Análisis de Riesgos y Puntos de Control Crítico. Este sistema requiere basta información sobre la incidencia y distribución del germen en los productos crudos, comportamiento a bajas temperaturas, susceptibilidad al calor y germicidas, potencial para desarrollar sobre las verduras crudas y cocidas, y posibles mecanismos de contaminación dentro de las plantas.

El CDC (Control Diseases Center) de Estados Unidos registra una disminución del 40% en los casos de listeriosis reportados entre 1989 y 1992. La reducción en la enfermedad es un testimonio de la efectividad del SARPCC en los programas del control de inocuidad de los alimentos y la capacidad para influenciar el comportamiento del consumidor al menos en ciertos grupos de la población (1).

La fábrica en la que se realizó el trabajo de campo de este estudio, es una planta moderna con adecuada infraestructura, cuyos productos alcanzan en general un nivel satisfactorio de contenido microbiano. Enfrenta sin embargo, el problema de satisfacción de la norma para *L. monocytogenes* que imponen los importadores. En este trabajo se aporta información fundamental para la implementación del sistema de ARPCC en la fábrica.

IV. OBJETIVOS

1. GENERAL

Evaluar el perfil de contaminación de *L. monocytogenes* en brócoli precocido y congelado dentro de una planta procesadora, y evaluar prácticas que conduzcan a la obtención de productos libres del microorganismo que satisfagan la norma de 0 *L.monocytogenes* en porciones de 25 g de alimento.

2. ESPECÍFICOS

2.1. Investigar la presencia de *L. monocytogenes* a lo largo del procesamiento del brócoli precocido y congelado incluido el equipo y otros factores potenciales de contaminación.

2.2. Determinar la sobrevivencia de *L. monocytogenes* a la congelación en brócoli precocido.

2.3. Evaluar la sanidad de la planta en base a organismos coliformes.

2.4. Determinar la susceptibilidad de *L. monocytogenes* a germicidas de uso común en plantas de alimentos.

2.5. Cuantificar el contenido de *L. monocytogenes* en muestras de producto precocido y congelado que resulten positivas a la prueba cualitativa.

V. TRABAJO EXPERIMENTAL

1. MATERIALES.

Autoclave eléctrica de mesa, Market-Forge
Baño maría con circulación mecánica, Precision 251
Baño maría con termostato, Arfrank
Bolsa de polietileno, presentación en rollo, sin marca comercial
Campana de flujo laminar, Alder
Centrífuga de mesa, Sol-Bat J300
Congelador a -18° , Nieto
Cuenta colonias, Quebec Reichert-Jung
Destilador de ósmosis inversa, Millipore
Homogenizador Stomacher, Seward 400
Horno para esterilización, Shel-Lab
Incubadoras a 30 y 35° , Felisa
Incubadora refrigeradora $6-70^{\circ}$ (22°), Precision Scientific
Láminas de acero inoxidable 2×2 cm
Lámpara de 110 V (Transiluminación de Henry)
Materiales de uso común en el laboratorio de microbiología
Micropipetas de $5-1000$ μL , Labsystems
Microscopio binocular de contraste de fases, Leica
Potenciómetro, Corning 220
Vitrina refrigerada, American
Vortex, Fisher Scientific Ind.

CEPAS

- * *Listeria monocytogenes* Scott A, donada por el Dr. Doyle, Universidad de Georgia.
- * *Listeria monocytogenes* nativa, aislada e identificada a partir de brócoli precocido y congelado en nuestro laboratorio (LMS-UAQ) durante el estudio.
- * *Rodococcus equi*, donada por la Universidad de Guadalajara
- * *Staphylococcus aureus*, donada por la Universidad de Guadalajara
- * *Escherichia coli* ATCC 10536, donada por la Universidad de Guadalajara

MEDIOS DE CULTIVO (60)

- Agar Base Sangre (ABS), Oxoid
- Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV), Oxoid
- Agar Cuenta Estándar (ACE), Bioxon
- Agar Cloruro de Litio-Feniletanol-Moxalactamo (LPM)
- Agar Oxford (OXF) y Agar Oxford Modificado (MOX)
- Agar Soya Tripticasa con Extracto de Levadura (AST-EL)
- Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI), Bioxon
- Caldo de Enriquecimiento para *Listeria* (LEB)
- Caldo de Enriquecimiento Secundario Fraser (CF)
- Caldo de Enriquecimiento de la Universidad de Vermont (UVM)
- Caldo Rojo Fenol (CRF), Bioxon
- Caldo Soya Tripticasa con Extracto de Levadura (CST-EL)
- Caldo Urea (CU), Bioxon
- Diluyente de peptona 0.1% (DP), Bioxon
- Medio de Rojo de Metilo y Voges Proskauer (RM-VP), Oxoid
- Medio SIM, Dibico
- Solución Salina Isotónica (SSI)

REACTIVOS Y COLORANTES (57)

Alcohol etílico al 95% (Gram)

Alfa-naftol, Sigma, al 5%, en solución alcohólica (Voges-Proskauer)

Antisuero para *Listeria monocytogenes* serotipo 1 y 4, polivalente, Difco

Creatina (Voges-Proskauer)

Cristal violeta, Sigma (Gram)

Hidróxido de potasio, Baker, 40%, solución acuosa (Voges-Proskauer)

Dispositivo para hibridación de DNA, GENE-TRAK

Lugol (Gram)

Manitol, Merk (Fermentación)

N,N,N,N-tetrametil p-feniléndiamina, Sigma (Oxidasa)

Peróxido de hidrógeno (Catalasa)

Ramnosa, Sigma (Fermentación)

Rojo de metilo, Sigma (Rojo de Metilo)

Safranina, Sigma (Gram)

Sangre de carnero (β -hemólisis)

Xilosa, Sigma (Fermentación)

2. METODOS.

Para el objetivo 1:

2.1 Investigar la presencia de *L. monocytogenes* a lo largo del procesamiento del brócoli precocido y congelado incluido el equipo y otros factores potenciales de contaminación. (Esquemas - 2 y 3)

1. Se preparó un diagrama del procesamiento del brócoli (Esquema - 1) con el propósito de determinar posibles puntos de ingreso de *L. monocytogenes*, ya sea mediante contaminación directa o cruzada (brócoli crudo y en proceso), a partir de gérmenes residuales en el equipo después de los tratamientos antimicrobianos aplicados.

2. Se retiraron porciones de aprox. 100 g de brócoli en diferentes etapas del proceso (Esquema - 1), se colocaron en bolsa de plástico y se transportaron al laboratorio. La mayoría de las muestras se examinaron 2-3 h después de su recolección. En caso contrario se almacenaron a 4-7°; el análisis se efectuó entonces, dentro de 24 h.

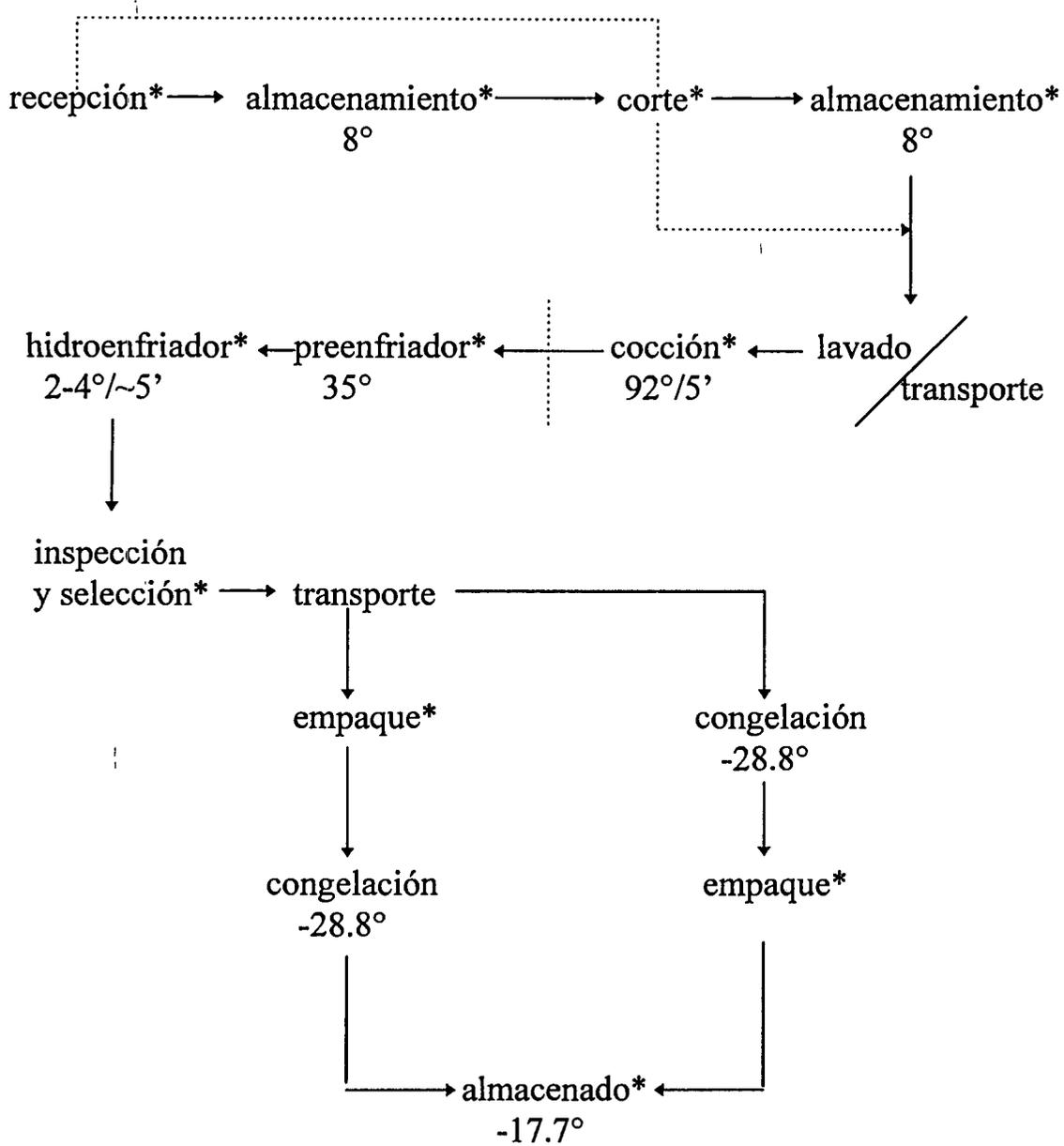
3. Para el muestreo de superficies expuestas (100 cm²) se utilizaron torundas estériles de algodón. El hisopo se aplicó en áreas menos accesibles del equipo (129).

4. La presencia de *L. monocytogenes* se determinó en porciones de 20 g por dos técnicas: la oficial de la Food and Drug Administration (FDA) (43, 60) y la del U.S. Department of Agriculture (USDA) (44) de Estados Unidos. En la primera se aplicó un enriquecimiento en caldo LEB y se aislaron las colonias en placas de OXF y LPM. En la segunda, el preenriquecimiento se preparó en caldo UVM, seguido de enriquecimiento en caldo Fraser. A partir de los tubos ennegrecidos el aislamiento se efectuó en medios MOX y LPM. En las superficies de equipo se siguió únicamente la técnica de la FDA.

5. El género y las especies de *Listeria* se identificaron en cultivos puros obtenidos a partir de los medios selectivos, mediante pruebas de metabolismo como se indica en la siguiente parte (2.1.1.)

ESQUEMA 1

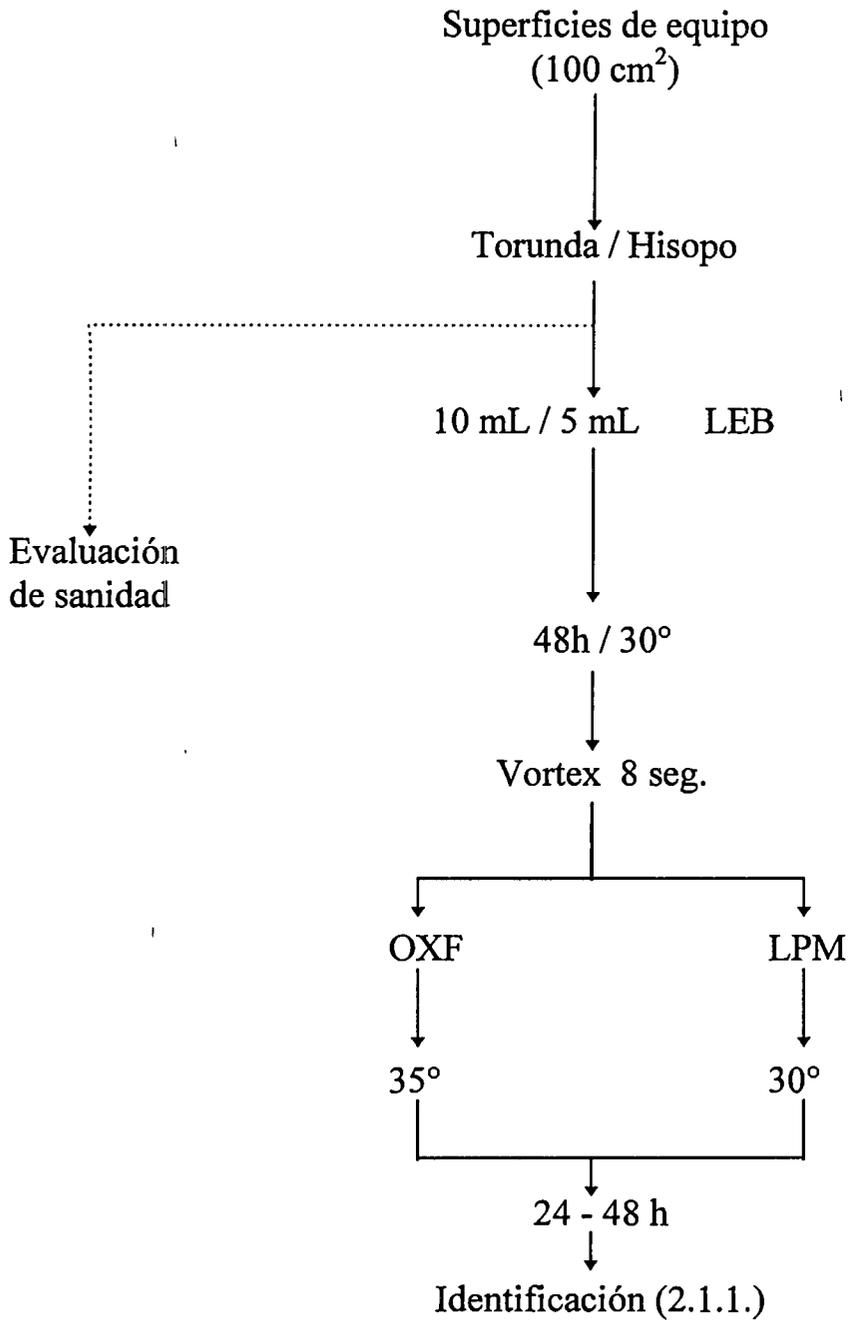
PROCESO DEL BROCOLI PRECOCIDO Y CONGELADO



* puntos de muestreo

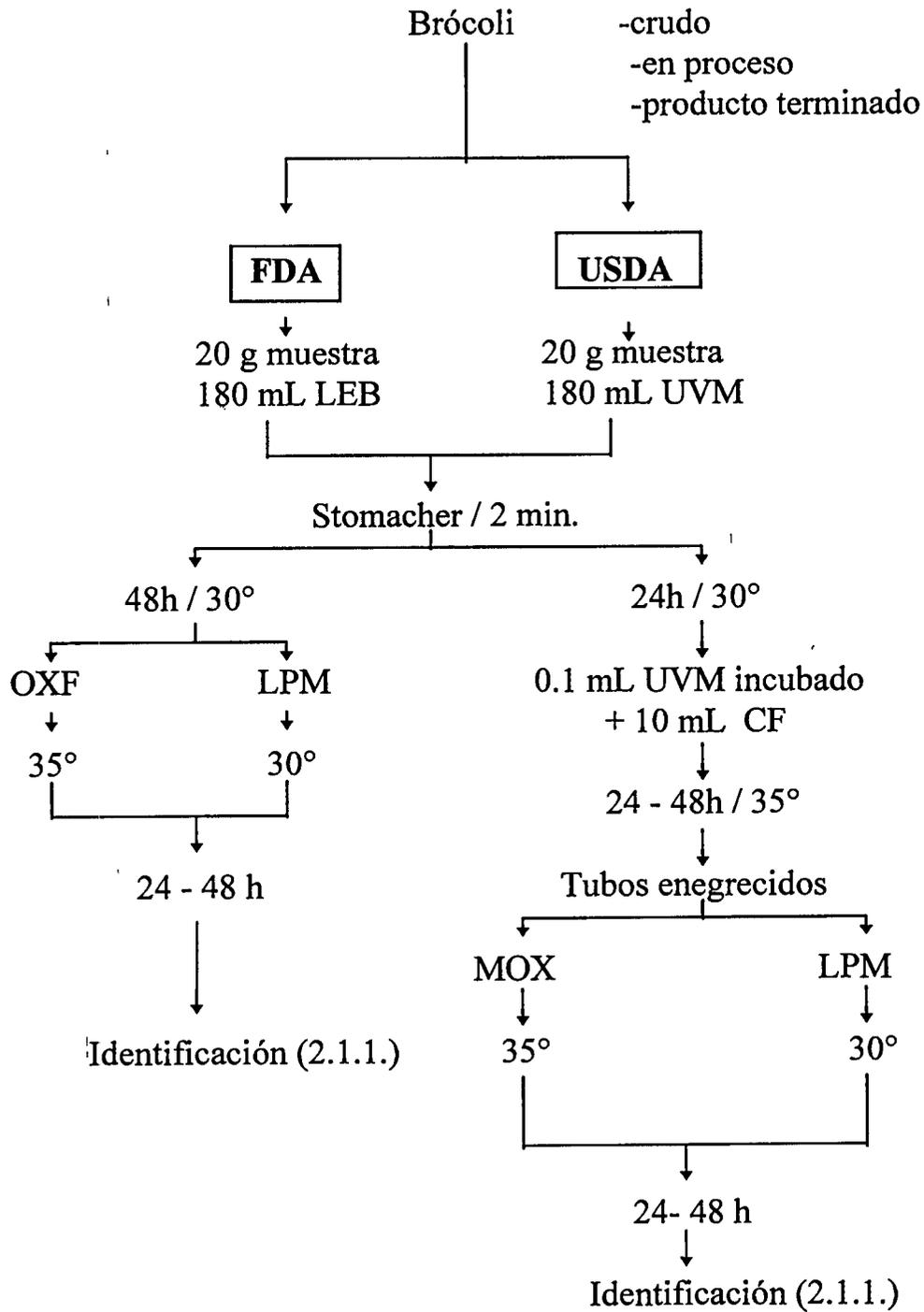
ESQUEMA 2

INCIDENCIA DE *L. monocytogenes* DENTRO DE LA FABRICA (SUPERFICIES DE EQUIPO)



ESQUEMA 3

INCIDENCIA DE *L. monocytogenes* EN BROCOLI DENTRO DE LA FABRICA



2.1.1. Identificación de género y especie de *Listeria* mediante pruebas morfológicas, de cultivo, metabólicas (109), serológicas (120) e hibridación de DNA (65). (Esquema - 4)

1. De los medios selectivos se estudiaron de 1-3 colonias sospechosas: en medio MOX y OXF son de color negro debido a la hidrólisis de la esculina del medio, y en LPM presentan un característico fenómeno, transiluminación de Henry (iridiscencia azul).

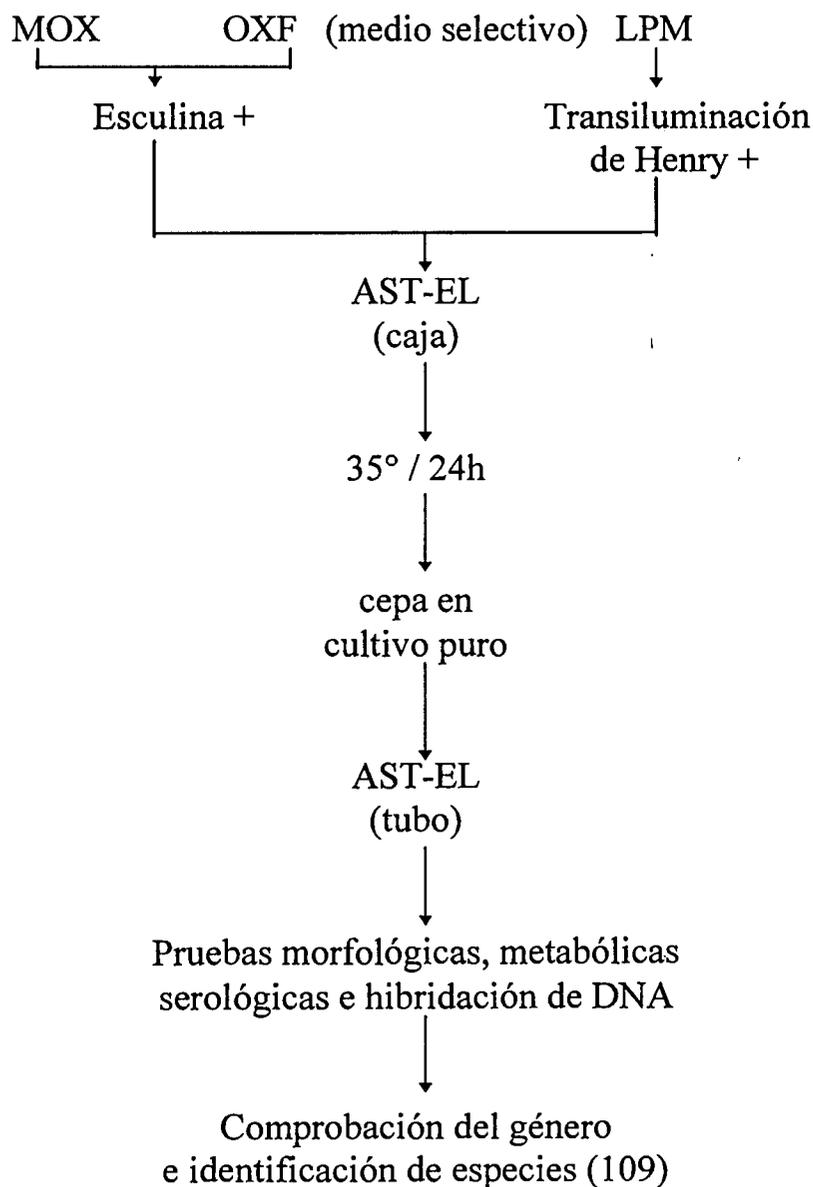
2. Las colonias se purificaron en placas de AST-EL y se conservaron en tubo inclinado de AST-EL.

3. Para cada cepa se aplicaron las siguientes pruebas (109) a partir de cultivos puros de cada una en AST-EL incubado a 35° por 18 h:

- | | |
|---------------------------|------------------------------------|
| -Gram | -Reacción de rojo de metilo |
| -Movilidad al microscopio | -Reacción de Voges-Proskauer |
| -Producción de catalasa | -Movilidad (SIM) |
| -Producción de oxidasa | -Urea |
| -Fermentación de lactosa | -Producción de β -hemólisis |
| -Fermentación de glucosa | -Aglutinación con antisueros 1 y 4 |
| -Fermentación de manitol | -Prueba de hibridación de DNA |
| -Fermentación de xilosa | |
| -Fermentación de ramnosa | |

ESQUEMA 4

IDENTIFICACION DE GENERO Y ESPECIE DE *Listeria* MEDIANTE PRUEBAS MORFOLOGICAS, DE CULTIVO, METABOLICAS, SEROLÓGICAS E HIBRIDACION DE DNA, A PARTIR DE LAS COLONIAS DESARROLLADAS EN LOS MEDIOS SELECTIVOS.



Para el objetivo 2:

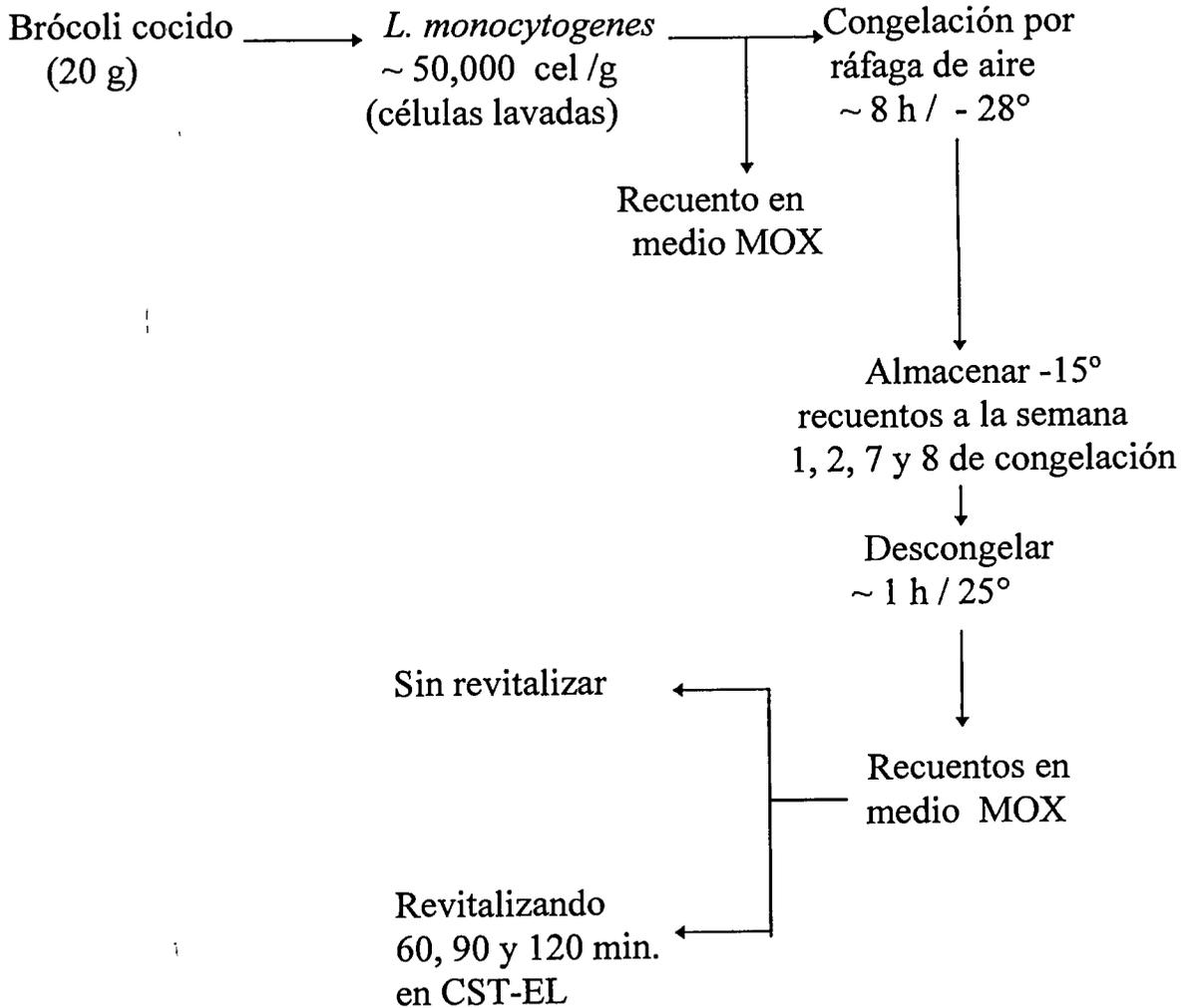
2.2. Determinar la sobrevivencia de *L. monocytogenes* a la congelación en brócoli precocido. (Esquema - 5)

1. Se prepararon cultivos frescos de la cepa: *L. monocytogenes* Scott A y de otra cepa de *L. monocytogenes* que recuperamos de brócoli precocido y congelado (nativa), en CST-EL (35°/18 h).
2. Los cultivos frescos se lavaron 3 veces por separado (centrifugando a 5,000 g /15 min.) y se resuspendieron en el volumen original con SSI estéril. Esta suspensión finalmente contiene aproximadamente 10^9 ufc/mL.
3. El estudio de sobrevivencia de *L. monocytogenes* se realizó con brócoli en florete que había sido cocido (colectado a la salida del cocedor). Las piezas seleccionadas no mostraban daño mecánico.
4. En bolsas de polietileno para cada cepa se colocaron en condiciones asépticas porciones de 20 ± 2 g.
5. A partir de las células lavadas de *L. monocytogenes* se preparó una suspensión que contuviera aproximadamente 10^6 ufc/mL.
6. En las partes internas del florete se distribuyó 1 mL de cada suspensión por separado para cada cepa, evitando derrames. La concentración final fue de ~50,000 ufc/g de brócoli listo para congelar. Generalmente el inóculo se absorbió rápidamente en el alimento.
7. Las bolsas con el producto inóculado se colocaron en cajas de cartón, cubriéndolas con papel encerado (3 porciones de brócoli por caja).
8. La congelación se efectuó en la misma planta procesadora mediante ráfaga de aire (“blast-frezer”) en un paquete debidamente protegido y aislado. La inoculación del brócoli se completó en aproximadamente 3 h. Las muestras se llevaron al laboratorio y se mantuvieron en congelación (-18°).

9. Para su análisis se retiraron las muestras y se dejaron descongelar a temperatura ambiente (1 h).
10. Con cada porción de 20 g se preparó una dilución decimal en CST-EL y se homogenizó en Stomacher durante 2 min.
11. El recuento se efectuó como se indica más adelante (2.2.15).
12. El resto de la suspensión se incubó a 35° en baño maría para favorecer la revitalización de los microorganismos. Los recuentos se efectuaron al cabo de 60 y 90 min.
13. El primer recuento de *L. monocytogenes* se practicó inmediatamente después de la inoculación (2.2.6). En el producto no inoculado se determinó el recuento de bacterias mesófilas aerobias.
14. El segundo recuento (que se designará en lo sucesivo tiempo cero), se realizó en el producto al término de la congelación (~6 h). Los recuentos posteriores, se efectuaron después de 1, 2, 7 y 8 semanas de congelación.
15. Los recuentos se realizaron por triplicado con las técnicas de extensión por superficie (ES) (130) y Miles-Misra (M-M) (57) sobre medio MOX.

ESQUEMA 5

SOBREVIVENCIA DE *L. monocytogenes* A LA CONGELACION EN BROCOLI PRECOCIDO



* Extensión en superficie
y Miles-Misra (48 h / 35°)

Para el objetivo 3:

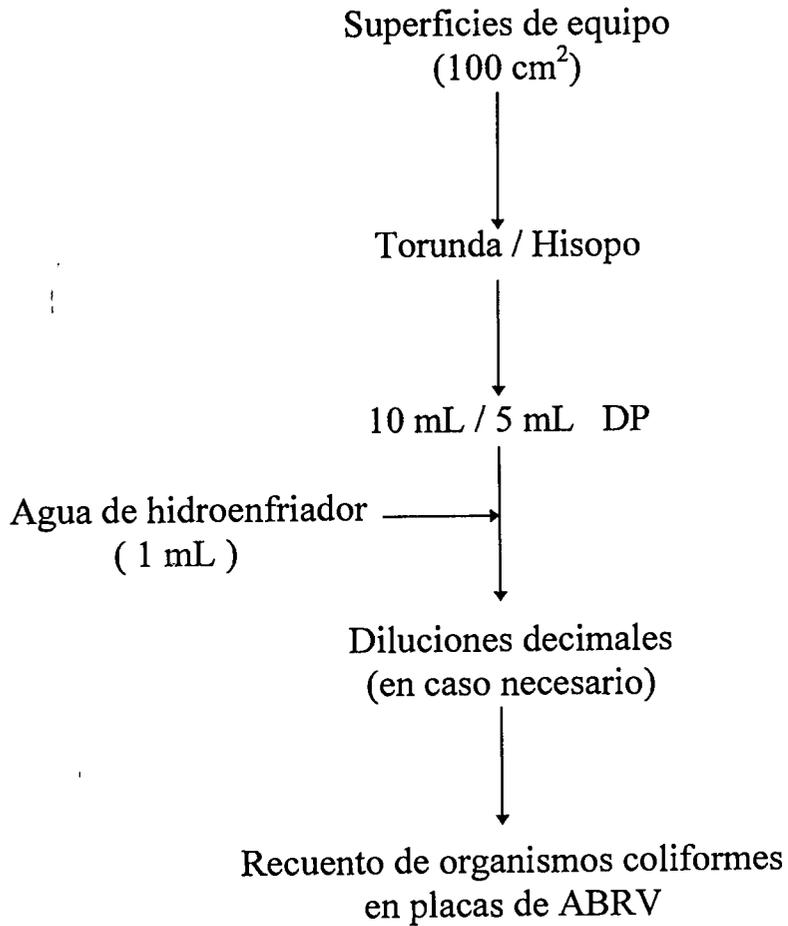
2.3. Evaluar la sanidad de la planta en base a organismos coliformes.

(Esquema - 6)

1. Las muestras de las superficies del equipo (100 cm^2) se obtuvieron con torundas, y con hisopo para partes menos accesibles del equipo (129).
2. Se seleccionaron los puntos de muestreo entre las áreas más expuestas y susceptibles de acumular residuos de producto, así como áreas a punto de higienizar y recién higienizadas previo al inicio de las operaciones. Se insistió especialmente en las etapas subsecuentes a la cocción.
3. En cada caso se registraron las condiciones de lavado y desinfección de las áreas involucradas.
4. Se incluyeron también muestras de agua del hidrogenfriador a diferentes tiempos a lo largo del proceso, y muestras de fragmentos de brócoli que se encontraran atrapadas en la malla transportadora (~ 1 g. en 9 mL de diluyente).
5. En el caso de las superficies, las torundas se transfirieron a bolsas de plástico que contenían 10 mL de diluyente de peptona; el extremo del hisopo con algodón se colocó en tubos conteniendo 5 mL del diluyente. Los fragmentos de brócoli que pesaban aproximadamente 1 g. se colocaron en 9 mL de diluyente de peptona. En todos los casos los microorganismos se liberaron en el diluyente, por frotación y agitación.
6. El contenido de organismos coliformes se efectuó por la técnica de recuento en placas de ABRV (57).

ESQUEMA 6

EVALUACIÓN DE LA SANIDAD EN BASE A ORGANISMOS COLIFORMES



Para el objetivo 4:

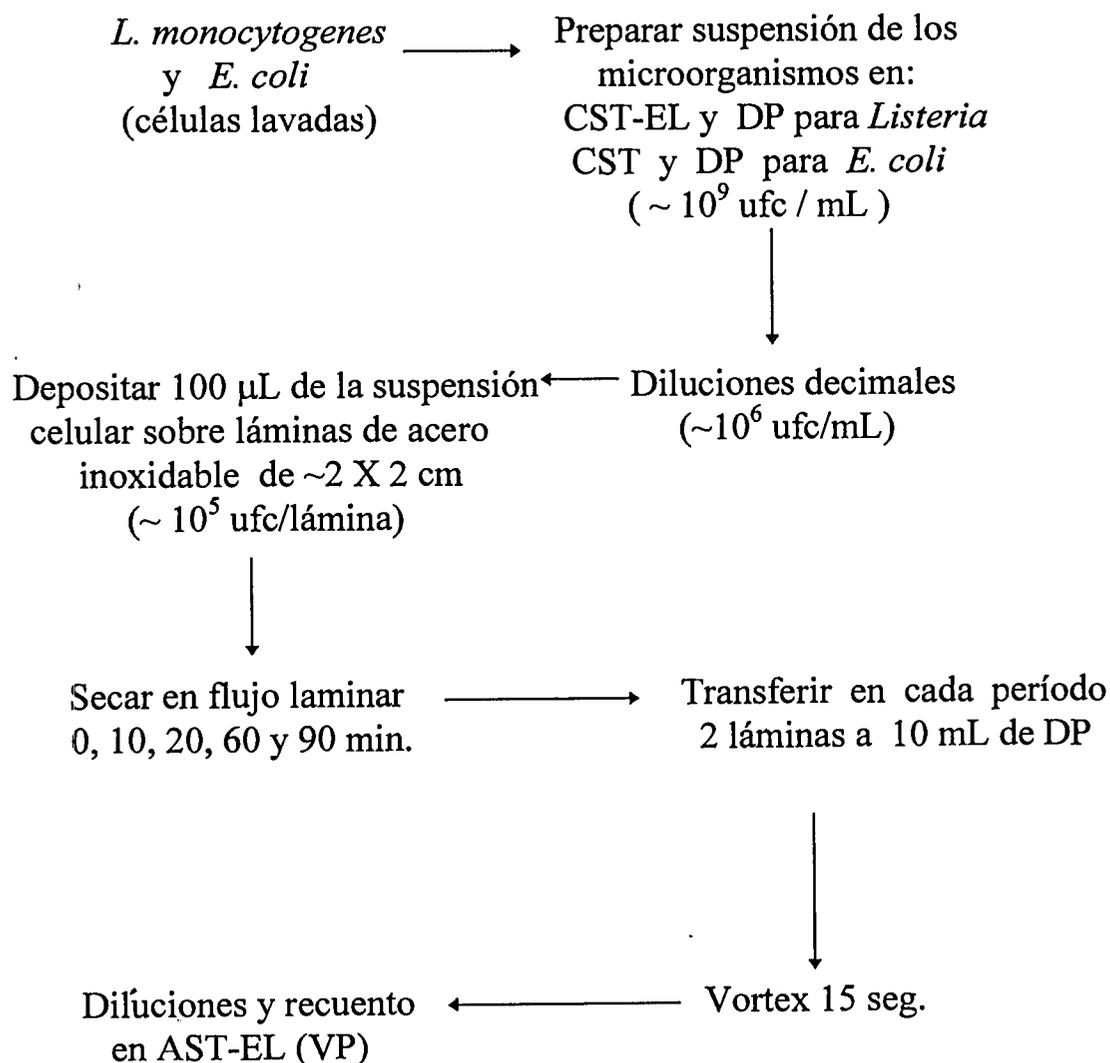
2.4. Determinar la susceptibilidad de *L. monocytogenes* a germicidas de uso común en plantas de alimentos.

2.4.1. Selección del vehículo del microorganismo previo al secado sobre placas de acero inoxidable. (Esquema - 7).

1. Por separado se prepararon cultivos frescos de *L. monocytogenes* nativa en CST-EL y de *Escherichia coli* ATCC 10536 en CST, ambos a 35°/18 h.
2. Los cultivos se lavaron 3 veces (centrifugando 5,000 g /15 min.) en SSI estéril y se resuspendieron por separado en el volumen original en CST-EL y DP para *L. monocytogenes* y CST y DP para *E. coli* (esta suspensión finalmente contenía $\sim 10^9$ ufc/mL).
3. Las diluciones decimales se prepararon en los mismos diluyentes usados en la resuspensión, hasta disponer de una concentración de $\sim 10^6$ ufc/mL.
4. En láminas independientes de acero inoxidable se depositaron 100 μ L de la suspensión anterior de manera que el número de listerias por lámina fuera de aproximadamente 10^5 ufc.
5. Las láminas con el inóculo se mantuvieron en la campana de flujo laminar y se transfirieron por separado al cabo de 0, 10, 20, 60 y 90 min. (sequedad total), a un frasco que contenía 10 mL de diluyente de peptona.
6. Las bacterias sobrevivientes se liberaron de la lámina mediante agitación con Vortex durante 15 seg.
7. El número de sobrevivientes se determinó en diluciones decimales, por recuento en AST-EL, mediante la técnica de Vaciado en Placa (VP) (57, 130).

ESQUEMA 7

SELECCION DEL VEHICULO PARA LA INOCULACION DEL MICROORGANISMO SOBRE PLACAS DE ACERO INOXIDABLE.

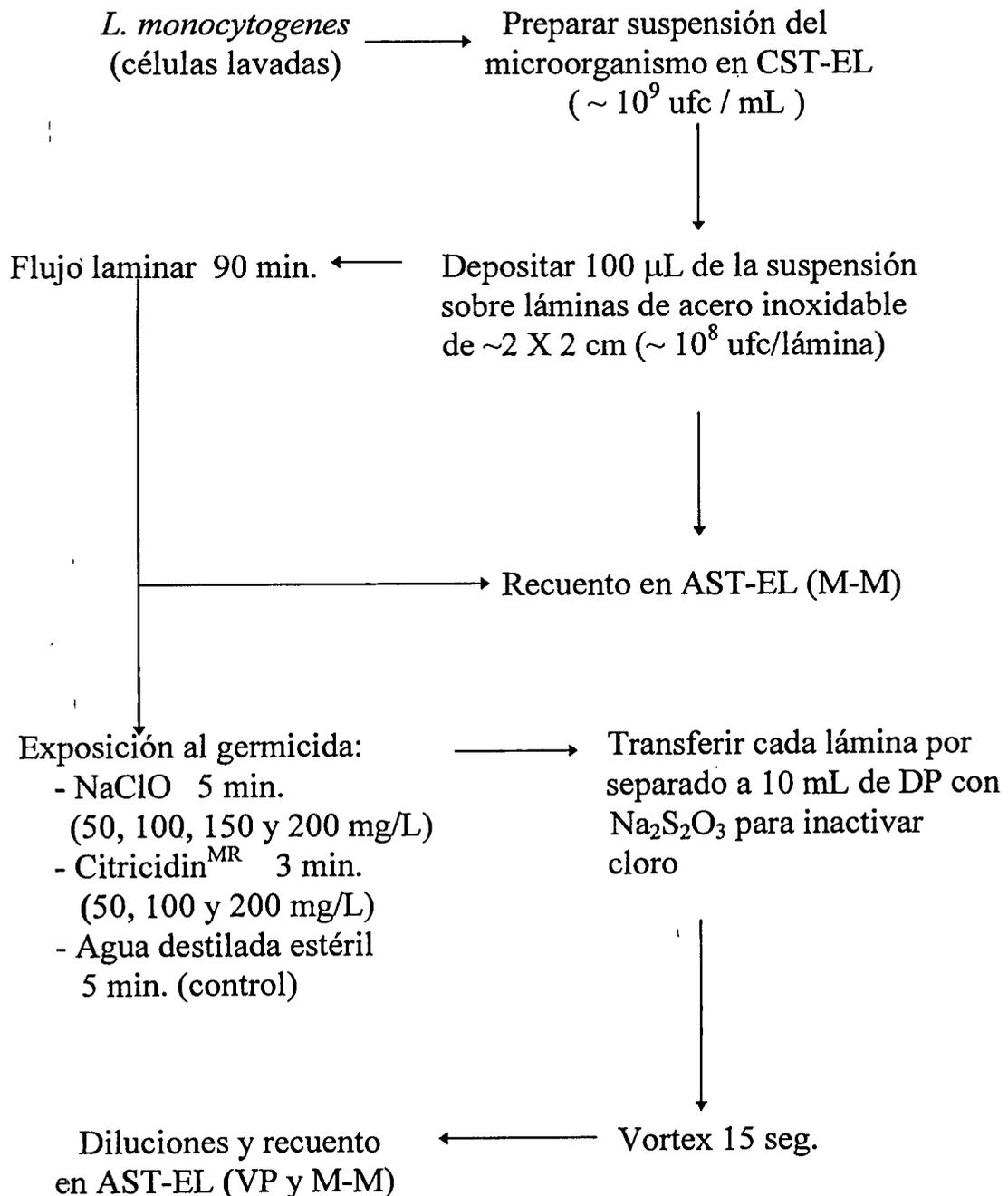


2.4.2. Susceptibilidad de *L.monocytogenes* a compuestos clorados y un producto comercial a base de sustancias naturales (Citricidin^{MR}), sobre superficies de acero inoxidable. (Esquema - 8).

1. Un cultivo fresco (35°/18 h) de *L. monocytogenes* nativa en CST-EL se lavó 3 veces (centrifugando 5,000 g /15 min.) en SSI estéril y se resuspendió en el volumen original en CST-EL. (Esta suspensión finalmente contenía $\sim 10^9$ ufc/mL).
2. De la suspensión anterior se depositaron 100 μ L en cada lámina de acero inoxidable ($\sim 10^8$ ufc/lámina) por duplicado.
3. El número de células inoculadas en AST-EL, se determinó siguiendo la técnica de Miles-Misra (57).
4. Las láminas inoculadas se mantuvieron en campana de flujo laminar durante 90 min. (sequedad total) y se contaron las células sobrevivientes en AST-EL, con la misma técnica.
5. Se incluyó un control, consistente en láminas inoculadas expuestas 5 min. (por inundación) en agua destilada estéril.
6. Las placas con el inóculo se expusieron por inmersión en soluciones de hipoclorito de sodio que contenían 50, 100, 150 y 200 mg/L de cloro activo durante 5 minutos. La concentración de cloro activo se determinó por titulación con tiosulfato de sodio 0.01N (36).
7. En forma similar, la evaluación del Citricidin^{MR} se realizó a 3 concentraciones (50, 100 y 200 mg/L) con tiempos de exposición de 3 min.
8. Cada lámina tratada se transfirió a un frasco con 10 mL de diluyente de peptona adicionado de tiosulfato de sodio para inactivar, en su caso, el cloro.
9. El frasco con la lámina se agitó en vortex durante 15 seg. y se prepararon diluciones decimales a partir de la suspensión obtenida.
10. El recuento se efectuó en AST-EL, utilizando las técnicas de vaciado en placa (VP) y Miles-Misra (M-M) (57, 130).

ESQUEMA 8

SUSCEPTIBILIDAD DE *L. monocytogenes* A COMPUESTOS CLORADOS Y UN PRODUCTO COMERCIAL A BASE DE SUSTANCIAS NATURALES (CITRICIDIN^{MR}) SOBRE SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE



Para el objetivo 5:

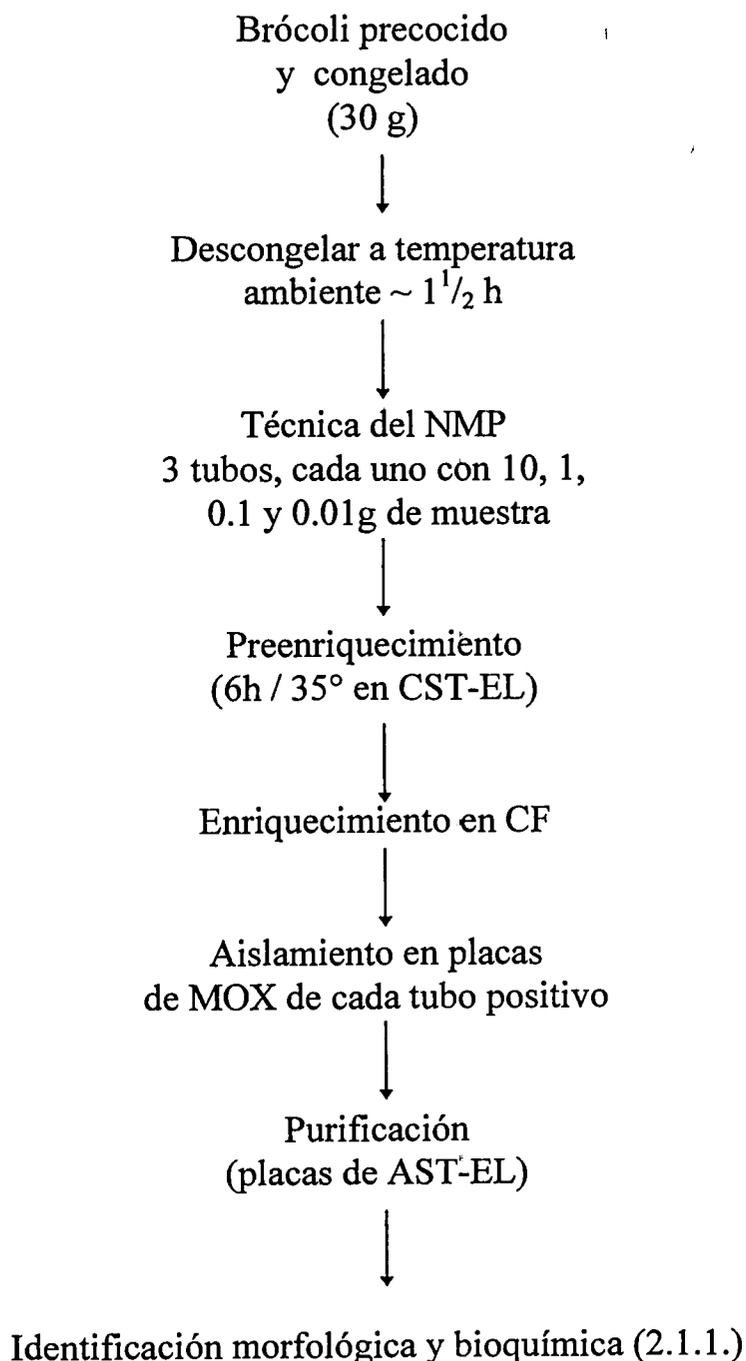
2.5. Cuantificar el contenido de *L.monocytogenes* en muestras de producto precocido y congelado que resulten positivas a la prueba cualitativa.

(Esquema-9).

1. Entre las muestras conservadas en congelación se seleccionaron 7 que habían resultado positivas a *L. monocytogenes*..
2. Se dejaron descongelar a temperatura ambiente durante $\sim 1\frac{1}{2}$ h y mediante la técnica del número más probable (NMP) (24, 57, 100) con series de 3 tubos, se determinó el número de sobrevivientes (Esquema 9).
3. El caldo de enriquecimiento consistió en CST-EL (6h a 35°), y como medio presuntivo se uso CF. De cada tubo positivo se inocularon placas de medio MOX para la confirmación de la listeria.
4. La combinación de tubos positivos se computó a partir de aquellos que resultaron positivos a la identificación morfológica y bioquímica de las colonias sospechosas.

ESQUEMA 9

CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE *L. monocytogenes* EN MUESTRAS DE PRODUCTO PRECOCIDO Y CONGELADO QUE RESULTEN POSITIVAS A LA PRUEBA CUALITATIVA



A lo largo del estudio de laboratorio, se siguieron prácticas de trabajo especialmente escrupulosas para evitar la diseminación de *L. monocytogenes* en las áreas de trabajo. Al término de cada operación y al inicio de las labores cada día, se aplicó una desinfección a las superficies de trabajo (200 mg/L de yodo libre, a partir de un yodóforo).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El interés por eliminar *L. monocytogenes* en brócoli precocido y congelado surge de una actitud preventiva ante los riesgos de listeriosis en la población y de la condición que imponen los convenios de importación-exportación del alimento. La rigidez de esta exigencia a su vez, se fundamenta en el conocimiento de brotes de listeriosis que llegan a mostrar niveles alarmantes de letalidad, asociados al consumo de alimentos (58, 77, 86, 103, 112, 114, 115, 116). En general, las fábricas involucradas no fueron construidas y equipadas tomando en consideración tal exigencia. Bacterias patógenas en las verduras procesadas, como *Salmonella*, con fuentes de contaminación relacionadas principalmente con la presencia de desechos humanos y animales, pueden ser controladas aplicando condiciones de trabajo cuya eficiencia está avalada por la práctica en toda la industria alimentaria.

Para entender la naturaleza del problema que nos ocupa, es necesario tomar en cuenta ciertas características ecológicas y fisiológicas que permiten a *L. monocytogenes*, por un lado, acceder con facilidad a los alimentos, y por otro, multiplicarse activamente en ellos. En efecto, el germen se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente, y no muestra, como las bacterias lácticas por ejemplo, demandas nutricionales especiales (109); posee además un intenso carácter psicrótrofo (5, 109). No es de extrañar entonces, que con facilidad se establezca en plantas procesadoras de casi cualquier tipo de alimentos. Así lo ilustran los resultados que hemos obtenido en este trabajo.

Diversos estudios sobre *Listeria* spp. han demostrado la ubicuidad del organismo en el medio ambiente de las plantas procesadoras, por lo menos el género, se encuentra en plantas de cárnicos y lácteos, aún después de rigurosos regímenes de higienización (122).

Los puntos primarios de contaminación potencial incluyen (14, 135):

- Superficies de contacto directo con el producto
- Personal que maneja el producto entre las etapas de cocción y el empaclado final
- Artículos como la ropa o los guantes que pueden entrar en contacto directo con el producto

El segundo nivel de importancia es el medio ambiente inmediato en las áreas de exposición del producto, incluyendo las condiciones sanitarias de:

- pisos, paredes, techos, sistemas de aire acondicionado y calefacción, drenajes, contenedores de condensados, otros equipos que puedan estar en las áreas inmediatas pero no son destinadas para estar en contacto directo con el producto

El tercer nivel de importancia lo constituye el riesgo de contaminación cruzada. Este se puede dar a través de:

- tráfico en el área de producción y el área de empaclado (gente y equipo)
- enfriadores de producto
- áreas del equipo que no entran en contacto con el producto o estructuras de soporte
- otras áreas que pueden tener impacto en las condiciones del medio ambiente en las áreas de exposición del producto, como pasillos adyacentes, comedores, etc.

Los sitios que se han identificado como reservorios potenciales de *Listeria* incluyen, apagadores, rodillos de los transportadores, puertas selladas con plástico, transportadores porosos o de fibra, rebanadoras, agua estancada en las áreas de producción (14, 122). Se puede sugerir que las condiciones de sequedad y la restricción de residuos de alimento, contribuyen al control del microorganismo (122).

La incidencia de *Listeria* se correlaciona bien con las locaciones húmedas, particularmente transportadores, pisos y drenajes (122).

Las plantas procesadoras deben considerar el problema de utilizar materia prima contaminada, que aunque no presentara niveles considerables de *L. monocytogenes*, bien pudiera desarrollar en algún punto del proceso posterior al tratamiento térmico. Es necesario procesar de manera que el germen se inactive hasta niveles de 0 en 25 g., y que a continuación, y hasta el empacado no sufra recontaminación alguna. Las fábricas en el país cuentan con buena infraestructura, pero no están diseñadas para cumplir con normas tan severas, donde además, generalmente aplican sistemas tradicionales en el control y aseguramiento de la inocuidad microbiana de los alimentos como la inspección y análisis de producto terminado.

1. Distribución de *L. monocytogenes* durante el procesamiento del brócoli precocido y congelado.

Listeria en general, y *L. monocytogenes* en particular, se aislaron del brócoli en todas las etapas del proceso, incluido el equipo. La frecuencia de *Listeria* varió de 11% en el producto crudo a 42%, ya precocido y congelado. Específicamente, *L. monocytogenes* se recuperó en 3 de 101 en el primer caso (3%) y en 45 de 127 (35%) del segundo (Tabla 2, Gráfica 1). Debe destacarse, como ya se anotó, que en la planta existe y se aplica de manera permanente un programa de sanidad que puede calificarse de aceptable, aunque consideramos que requiere una revisión cuidadosa en función de la experiencia derivada de este trabajo. De los resultados consignados, dos hechos merecen ser destacados: 1) la alta cifra del patógeno que detectamos en el producto terminado, se propicia o genera dentro de la planta, y 2) mientras que la frecuencia de las especies predominantes en el producto crudo están muy apartadas de la correspondiente a *L. monocytogenes* (3% positivo contra 11%, es decir casi la cuarta parte), en el producto terminado la diferencia es mucho menos notable (35 y 42%

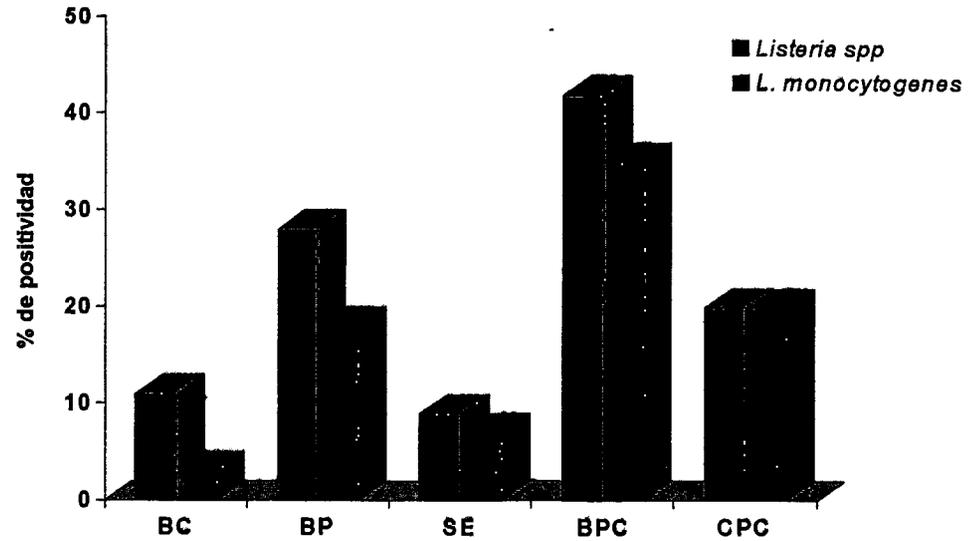
DISTRIBUCION DE *Listeria* spp. Y *L. monocytogenes* DENTRO DE LA PLANTA PROCESADORA

marzo '95 - noviembre '96

Tabla 2

	MUESTRAS		
	Examinadas	Positivas a	
		<i>Listeria</i> spp. (%)	<i>L. monocytogenes</i> (%)
Brócoli crudo (BC)	101	11 (11)	3 (3)
Brócoli en proceso (BP)	71	20 (28)	13 (18)
Superficies de equipo (SE)	55	5 (9)	4 (7)
Brócoli precocido y congelado (BPC)	127	53 (42)	45 (35)
Coliflor precocida y congelada (CPC)	10	2 (20)	2 (20)
TOTAL	364	91 (25)	67 (18)

Gráfica 1



respectivamente). La especie patógena exhibe así, una mayor capacidad de sobrevivencia a los germicidas y/o a la congelación que se aplican durante el procesamiento, o una mayor capacidad de multiplicación en el brócoli, también en las condiciones de operación de la planta. La multiplicación puede ocurrir por ejemplo, en los residuos de brócoli o en el agua del hidrogenfriador. Ambas posibilidades no son por supuesto, mutuamente excluyentes, y fueron motivo de estudio en este trabajo.

El brócoli se muestreó en 5 etapas del proceso, posteriores a la cocción: la salida del cocedor, la salida del hidrogenfirador, en la banda del llenado del producto que se congela ya empacado ("Wet Pack"), y a la entrada y salida del túnel para el producto que se congela a granel (IQF). Las mayores cifras de incidencia se observan en los puntos 3 y 5 (Tabla 3, Gráfica 2). Es interesante señalar que en la etapa número 3 el producto se encuentra expuesto al medio ambiente por períodos más prolongados; también corresponde a la que es objeto de mayor manipulación por los trabajadores de la línea. En un estudio realizado por Garg y col. (63), se evaluó la microbiología de verduras frescas mínimamente procesadas (rebanadas). Encontraron que las hojas de lechuga y col contenían relativamente bajas cuentas de mesófilos aerobios, aproximadamente 10^4 ufc/g, pero las cuentas de los productos empacados eran considerablemente más altas ($\sim 10^6$ ufc/g) debido a la contaminación de la rebanadora. Después de la rebanadora, el producto fue colocado en bolsas de nylon las cuáles fueron sumergidas en agua clorada helada. Aunque un enjuague con agua clorada ha mostrado ser efectivo bajo condiciones de laboratorio (2), las cuentas no siempre fueron reducidas en el procesamiento. La fábrica se esforzaba por mantener 300 mg/L de cloro libre, pero fue difícil, indudablemente debido a que la materia orgánica reacciona rápidamente con el cloro y la adición de cloro es manual (63).

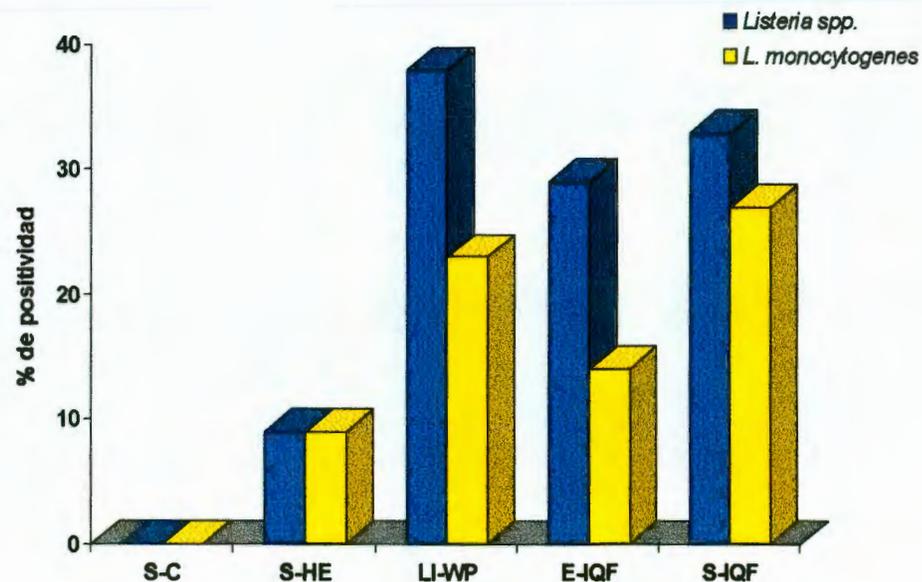
El promedio de la cuenta de mesófilos aerobios para los diferentes productos vegetales generalmente excede 10^5 por g. A diferencia de los vegetales congelados, los cuáles generalmente se encuentran precocidos, los productos cortados en fresco no son expuestos a una etapa de control crítico que elimine una proporción importante de la

DISTRIBUCION DE *Listeria* spp. Y *L. monocytogenes* EN BROCOLI SEGUN ETAPA DE PROCESAMIENTO

Tabla 3

ETAPA	MUESTRAS		
	Examinadas	Positivas a <i>Listeria</i> spp. (%)	Positivas a <i>L. monocytogenes</i> (%)
Salida cocedor (S-C)	5	0 (0)	0 (0)
Salida hidrocenfrador (S-HE)	11	1 (9)	1 (9)
Llenado "Wet-Pak" (LI-WP)	26	10 (38)	6 (23)
Entrada IQF (E-IQF)	14	4 (29)	2 (14)
Salida IQF (S-IQF)	15	5 (33)	4 (27)
TOTAL	71	20 (28)	13 (18)

Gráfica 2



contaminación microbiana (63). La protección contra la contaminación en las áreas de producto terminado no era, durante los períodos de estos muestreos, todo lo riguroso que debiera. A los trabajadores se les permitía utilizar suéter cuyas mangas sobresalían de las batas de trabajo hasta cerca de las manos. En algunos casos los guantes que usaban se encontraban desgarrados.

La participación del equipo como fuente de contaminación se ilustra en la Tabla 4. De aquel que entra en contacto con el brócoli (cocedor, banda del hidrofriador, llenadora de "Wet Pack", malla vibradora a la entrada del congelador IQF y banda continua a la salida del IQF) se obtuvieron 55 muestras, mientras se encontraban en operación. En una ocasión se aisló *Listeria* distinta a *L. monocytogenes* del hidrofriador. En cuatro ocasiones más se recuperó el germen, dos a la entrada y dos a la salida del IQF, en todos los casos *L. monocytogenes*. No obstante que el muestreo no fue muy intensivo, el hallazgo del patógeno en el equipo, y precisamente en las últimas etapas del proceso cuando está próximo a ingresar al congelador, es fuertemente sugestivo de un programa de sanidad y de prácticas de operación que deben ser revisadas. Durante el transporte del alimento virtualmente es imposible evitar el desprendimiento de pequeñas porciones que se pueden fijar en localidades próximas, pero fuera de las bandas. La temperatura del producto podría acercarse a la ambiental y permitir actividad de coliformes y del propio patógeno. Constituye una importante fuente potencial de contaminación directa o indirecta hasta porciones de brócoli que entran a la etapa de congelación. Aún en niveles mínimos, estos accidentes sin duda constituyen el antecedente de una proporción de las muestras que resultan positivas a la prueba cualitativa de *L. monocytogenes* en el producto terminado.

Hasta este punto no parecería propio incluir la higienización como un punto de control crítico dentro del SARPC. Aunque la limpieza y la higienización son muy importantes, normalmente se espera que estas operaciones se destinen a través de los programas de buenas prácticas de manufactura y no ser suficientemente significante en términos de control de riesgos para ser incluido dentro del SARPC. Sin embargo,

TABLA 4

DISTRIBUCION DE *Listeria* spp. Y *L. monocytogenes* EN SUPERFICIES DE EQUIPO SEGUN ETAPA DE PROCESAMIENTO

ETAPA	MUESTRAS		
	Examinadas	Positivas a <i>Listeria</i> spp. (%)	Positivas a <i>L. monocytogenes</i> (%)
Cocedor	5	0 (0)	0 (0)
Hydroenfriador	26	1 (4)	0 (0)
Llenado "Wet-Pak"	9	0 (0)	0 (0)
Entrada IQF (malla vibradora)	9	2 (22)	2 (22)
Salida IQF (banda lisa)	6	2 (33)	2 (33)
TOTAL	55	5 (9)	4 (7)

cuando se trata de alimentos listo para su consumo que no reciben una cocción al final del empaçado suficiente para eliminar a los patógenos, las acciones de control deben dirigirse al medio ambiente inmediato con el que entran en contacto los alimentos. En el caso particular de estos productos, es apropiado destinar la higienización utilizando técnicas de manejo del SARPCC (14).

El punto central del control de *Listeria* se enfoca en los puntos potenciales de contaminación del producto localizados entre la cocción (listericida), y la etapa en el proceso donde el producto es protegido de una recontaminación mediante el empaçado (14).

Es notable el predominio de la especie *L. monocytogenes* entre todas las demás especies de *Listeria* aisladas de brócoli muestreado en diferentes etapas del procesamiento. En conjunto, de 119 aislamientos del género 65 (54.6%) correspondieron a la especie patógena (Tabla 5). Esta preponderancia es aplicable en el brócoli congelado y en el brócoli en proceso, así como en los muestreos del equipo. Sólo *L. denitrificans* apareció con ligera mayor frecuencia en el brócoli crudo. Dado que tal diferencia es altamente significativa ($p < 0.05$) resulta necesario delinear alguna explicación al respecto. Es posible que *L. monocytogenes*, al menos las cepas que de alguna manera llegan a colonizar diferentes puntos dentro de la planta, en efecto posea una mayor resistencia a la acción de los germicidas, de sobrevivencia en la superficie del equipo, de desarrollo en el brócoli cocido o de competir con la flora asociada en los residuos del alimento. Más de una de estas aserciones podría tener vigencia.

El singular comportamiento de *L. monocytogenes* se expresa también en la frecuencia con la cual se recupera a partir del producto terminado, según la época del año. En la época fría (diciembre a marzo) la positividad fue de 59% (16 de 27 muestras distribuidas en muestreos semanales) (Tabla 7), mientras que en el resto del año la cifra fue de 39% (21 de 54 muestras) (Tabla 6). Como la positividad en el brócoli crudo fue muy baja a lo largo de los 20 meses de muestreo (3 de 101) (Tabla 2), la diferencia anotada antes debe estar propiciada por factores que se presentan

TABLA 5

ESPECIES DE *Listeria* EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE PROCESAMIENTO DE BROCOLI PRECOCIDO Y CONGELADO

Especie	Brócoli crudo (%)	Superficies de equipo (%)	Brócoli en proceso (%)	Brócoli congelado (%)	TOTAL (%)
<i>L. monocytogenes</i>	3 (23)	4 (67)	13 (46)	45 (63)	65 (55)
<i>L. denitrificans</i>	5 (38)	0 (0)	9 (32)	9 (13)	23 (19)
<i>L. welshimeri</i>	2 (15)	1 (17)	1 (4)	2 (3)	6 (5)
<i>L. innocua</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (4)	3 (3)
<i>L. murrayi</i>	0 (0)	1 (17)	2 (7)	2 (3)	5 (4)
<i>L. sp</i>	3 (23)	0 (0)	3 (11)	11 (15)	17 (14)
TOTAL	13	6	28	72	119

TABLA 6

**DISTRIBUCION DE *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*
DENTRO DE LA PLANTA PROCESADORA**

marzo '95 - noviembre '95

	MUESTRAS		
	Examinadas	Positivas a <i>Listeria</i> spp. (%)	Positivas a <i>L. monocytogenes</i> (%)
Brócoli crudo	24	3 (13)	1 (4)
Brócoli en proceso	22	6 (27)	2 (9)
Superficies de equipo	47	5 (11)	4 (9)
Brócoli precocido y congelado	54	29 (54)	21 (39)
Coliflor precocida y congelada	10	2 (20)	2 (20)
TOTAL	157	45 (29)	30 (19)

TABLA 7

**DISTRIBUCION DE *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*
DENTRO DE LA PLANTA PROCESADORA**

diciembre '95 - marzo '96

	MUESTRAS		
	Examinadas	Positivas a <i>Listeria</i> spp. (%)	Positivas a <i>L. monocytogenes</i> (%)
Brócoli crudo	28	5 (18)	1 (4)
Brócoli en proceso	14	8 (57)	6 (43)
Superficies de equipo	0	0 (0)	0 (0)
Brócoli precocido y congelado	27	16 (59)	16 (59)
Coliflor precocida y congelada	0	0 (0)	0 (0)
TOTAL	69	29 (42)	23 (33)

dentro de la planta. Con la información disponible, restringida además por un número de muestras más bien reducido, es difícil proponer explicaciones razonables.

El brócoli precocido y congelado resultó muy contaminado por *Listeria*. Globalmente la incidencia fue de 42% entre 127 muestras examinadas; *L. monocytogenes* se encontraba presente en 45 de ellas (35%), al menos una célula en 25 g del producto (Tabla 2). La distribución del patógeno en las variantes de brócoli procesado muestra un claro predominio en el florete (87%), seguido de los cortes (34%), el picado (26%) y las lanzas (16%) (Tabla 8 y Gráfica 3). La diferencia es altamente significativa ($p < 0.05$) mediante la prueba de χ^2 . Esta forma de presentación en general es la más apreciada; desafortunadamente, su mayor superficie expuesta y particular estructura, que le permite retener más líquidos y cualquier otro material (eventualmente contaminado), seguramente favorecen tal efecto. El atrapamiento de las listerias en el florete podría también conferirles algún grado de protección contra la pérdida de la viabilidad durante la congelación y descongelación. La especie predominante en todas estas muestras fue *L. monocytogenes*. Es clara la ineficiencia de la sanidad y operaciones de manejo del alimento a partir de la etapa de cocción, en donde como queda anotado, el microorganismo ha sido inactivado.

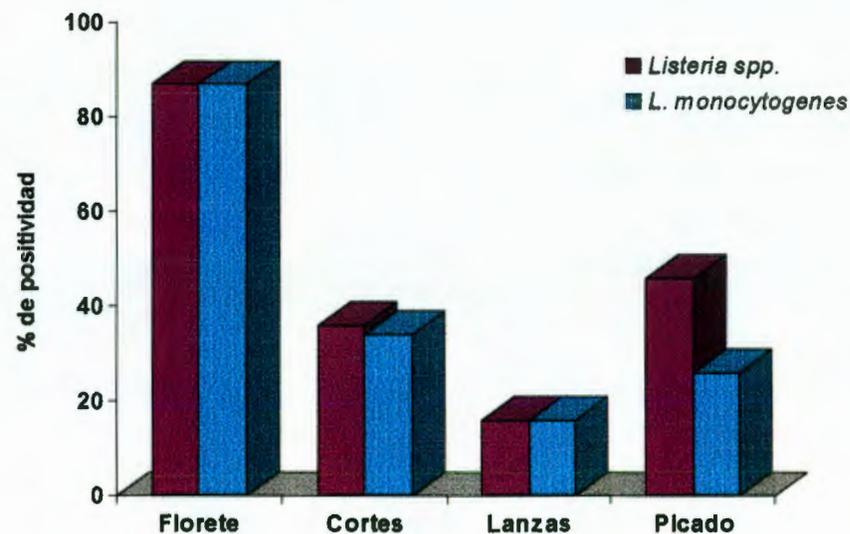
Dado que la congelación *per se* no destruye a los microorganismos, el precocido es considerado una práctica estándar en el procesamiento de alimentos congelados (29, 94). Las temperaturas empleadas generalmente son de 86 a 96°. Un buen precocido debe reducir la cuenta bacteriana 90%. Después del precocido, el producto debe manipularse adecuadamente antes y después de la congelación para evitar contaminaciones adicionales y reducir el crecimiento de los microorganismos (94).

DISTRIBUCION DE *Listeria* spp. Y *L. monocytogenes* EN BROCOLI SEGUN FORMA COMERCIAL

Tabla 8

PRESENTACION	MUESTRAS		
	Examinadas	Positivas a <i>Listeria</i> spp. (%)	Positivas a <i>L. monocytogenes</i> (%)
Florete	15	13 (87)	13 (87)
Cortes (cuts)	58	21 (36)	20 (34)
Lanzas (spears)	19	3 (16)	3 (16)
Picado (chopped)	35	16 (46)	9 (26)
TOTAL	127	53 (42)	45 (35)

Gráfica 3



2. Sobrevivencia de *L. monocytogenes* a la congelación en brócoli precocido.

Dentro del equipo de enfriamiento, pero fuera del agua, la temperatura es cercana a 8°. La inoculación de dos cepas de *L. monocytogenes* en brócoli cocido almacenado a temperatura ambiente muestra un incremento, al cabo de 2 horas y media, de más de cuatro veces el nivel inicial en la cepa Scott A y de 14 veces con una cepa aislada de brócoli muestreado en la planta (Tabla 9, Gráfica 4); se infiere que, efectivamente este alimento constituye un substrato favorable para la actividad de *L. monocytogenes*, con incrementos interesantes aún a temperatura apartada de la óptima. Los resultados de la Tabla 9 representan medias de los recuentos efectuados por dos técnicas: extensión en superficie y Miles Misra. Ambas técnicas son lo suficientemente confiables para efectuar recuentos bacterianos en alimentos (57, 130). Puede apreciarse una correspondencia muy aceptable en los resultados de las dos series a lo largo de los 150 min. con cada cepa (Tabla 10, Gráfica 5). Nos percatamos de ésta multiplicación, ya que se había calculado un inoculo de 50,000 ufc/g para el estudio de congelación, sin embargo, al término de la inoculación, el recuento previo a la congelación fue de ~2'000,000 de ufc/g de brócoli (Tabla 13).

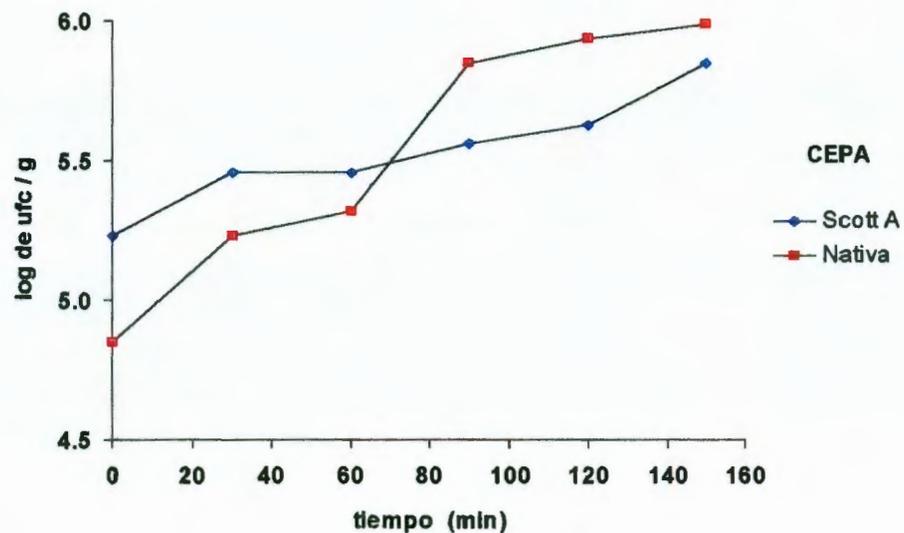
Dentro del interés central del trabajo (la evaluación de riesgos por *L. monocytogenes* en brócoli precocido y congelado), hay que agregar el estudio de su sobrevivencia en el alimento bajo congelación. El estudio consistió en inocular por separado dos cepas del patógeno en brócoli, congelarlo mediante ráfaga de aire en la propia planta, almacenarlo a -18° y monitorear periódicamente el número de sobrevivientes. Como es bien sabido, la congelación de un alimento suele provocar una condición de estrés en los microorganismos presentes. En condiciones de congelación la actividad microbiana es virtualmente nula. Algunos microorganismos son muy frágiles y pierden rápidamente su vitalidad; otros se inactivan progresivamente. En realidad, la muerte microbiana puede presentarse en el acto de congelación, durante el almacenamiento en tal condición o durante la descongelación. La velocidad del proceso de congelación tiene un efecto marcado en la sobrevivencia

ACTIVIDAD DE DOS CEPAS DE *L. monocytogenes* EN BROCOLI COCIDO ALMACENADO A TEMPERATURA AMBIENTE

Tabla 9

minutos a T° ambiente	<i>L. monocytogenes</i> / g de brócoli	
	Scott A	Nativa de brócoli
0	1.7×10^5	7.1×10^4
30	2.9×10^5	1.7×10^5
60	2.9×10^5	2.1×10^5
90	3.6×10^5	7.0×10^5
120	4.3×10^5	8.8×10^5
150	7.1×10^5	9.8×10^5

Gráfica 4



Temperatura ambiente: 28°

Temperatura inicial del brócoli: 22°

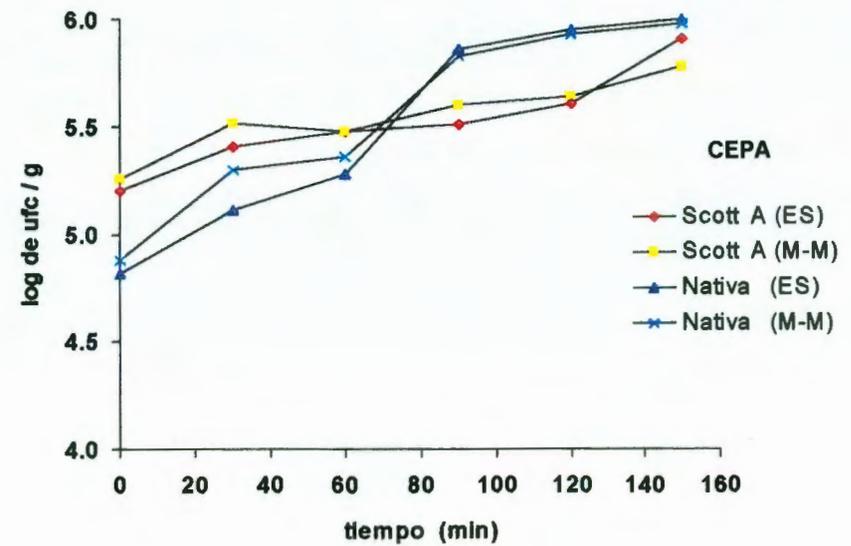
Temperatura del brócoli a los 150 minutos: 25°

ACTIVIDAD DE DOS CEPAS DE *L. monocytogenes* EN BROCOLI COCIDO ALMACENADO A TEMPERATURA AMBIENTE, CON DOS TECNICAS DE RECuento

Tabla 10

Gráfica 5

Tiempo de almacenamiento (minutos)	<i>L. monocytogenes</i> / g de brócoli			
	Scott A		Nativa de brócoli	
	Ext. en superficie	Miles-Misra	Ext. en superficie	Miles-Misra
0	1.6×10^5	1.8×10^5	6.6×10^4	7.5×10^4
30	2.6×10^5	3.3×10^5	1.3×10^5	2.0×10^5
60	2.8×10^5	3.0×10^5	1.9×10^5	2.3×10^5
90	3.2×10^5	4.0×10^5	7.2×10^5	6.8×10^5
120	4.1×10^5	4.4×10^5	9.0×10^5	8.5×10^5
150	8.1×10^5	6.0×10^5	1.0×10^6	9.5×10^5



(50). Bajo esta condición, muchos patógenos pierden capacidad para proliferar en medios selectivos en los cuales, en condiciones no estresantes, desarrollan ampliamente. Cuando los alimentos se someten a diversos procesos para prevenir el deterioro microbiano, con frecuencia algunos microorganismos sufren daños subletales debido al estrés al que son sometidas (59). En esta condición muestran una especial hipersensibilidad (59) hacia los agentes selectivos que se utilizan en los medios de cultivo. Como resultado del calentamiento o la congelación, la mayoría de los microorganismos presentan un daño metabólico, resultando en la inhabilidad para recuperarlo y formar colonias en medios selectivos donde normalmente se soporta bien el crecimiento (79). En general, la temperatura de congelación puede no afectar la sobrevivencia de los microorganismos significativamente, pero ciertos cultivos muestran algunas diferencias en la tasa de sobrevivencia a diferentes temperaturas (94). En estas circunstancias -28.9° ofrece gran protección. El congelamiento intermitente es más destructivo para los microorganismos que la congelación continua. Sin embargo, un producto puede deteriorar su calidad cuando se somete a descongelación y recongelación, aún cuando el contenido microbiano puede disminuir. Entonces, desafortunadamente no se consideran solamente los resultados microbiológicos para juzgar la calidad de las verduras congeladas (94). Diversas investigaciones han demostrado que las bacterias dañadas subletalmente incrementan los requerimientos nutricionales (19, 71) La adición de sustancias que pudieran revitalizar a las células de *Listeria*, como el piruvato de sodio, se sugieren en los casos donde el germen pudiera estar estresado, como el caso de alimentos congelados (60). Los recuentos conducen entonces a una subestimación del número real de células viables en el material de estudio. El problema se resuelve en muchos casos, sometiendo las bacterias dañadas a un proceso de recuperación en un medio no selectivo, previo a la inoculación en el medio adicionado de inhibidores. La inoculación del microorganismo en caldo soya tripticasa generalmente proporciona

resultados satisfactorios. El problema crítico es no prolongar la incubación más allá de lo necesario para la revitalización, antes de que el germen inicie su multiplicación.

Ordinariamente se recomiendan 2 h de incubación a 35° para cubrir la etapa de revitalización (59). Nosotros observamos que ya desde los 90 min. se presentaba un incremento en el número de células que rebasaba el doble del original: la cepa Scott A pasó de 48 000 a 180 000 ufc/g, y la cepa nativa de brócoli, de 58 000 a 380 000 ufc/g. Después de 60 min., en cambio, los incrementos respectivos fueron 75 000 y 82 000 ufc/g (Tabla 11). Los tratamientos aplicados al brócoli congelado, previo al recuento, se limitaron, por tanto, a 60 min.

El número de células recuperables de ambas cepas de *L. monocytogenes*, la Scott A y la nativa a partir del brócoli mantenido en congelación, disminuyó progresivamente (Tabla 12, Gráfica 6). Los resultados son muy consistentes entre las dos técnicas de recuento utilizadas (Tabla 13, Gráfica 7). La cepa Scott A mostró una mayor resistencia; habiendo partido de 80 000-70 000 ufc/g, en la semana 8 el número se había reducido a 3 000-6 000 ufc/g, según la técnica utilizada. En contraste, la cepa nativa ya no fue recuperable a partir de la semana 7. El comportamiento de la cepa Scott A, entonces, difiere de manera destacada respecto a la cepa nativa que aislamos del brócoli. Por una parte, la primera muestra una tasa de desarrollo menor en este alimento; por otra es más resistente a la congelación. Estas variaciones (más bien acentuadas), entre cepas de una especie que han sido aisladas de fuentes distintas (la Scott, proviene de casos de listeriosis humana, y ha sido mantenida en el laboratorio por varios años; la nativa, en cambio, recién recuperada y justamente del mismo alimento que se empleó como sustrato en el estudio), tienen implicaciones importantes en la evaluación de riesgos. Es necesario subrayar que los estudios de laboratorio generalmente consisten en modelos que simulan, un patrón de comportamiento de los microorganismos involucrados; los resultados son aplicables a las condiciones y materiales utilizados en ese modelo. Su inferencia a procesos que se efectúan fuera del laboratorio debe ser conservadora.

TABLA 11

**EFFECTO DEL TIEMPO DE REVITALIZACION EN CST-EL EN LA
RECUPERACION DE DOS CEPAS DE *L. monocytogenes*
A PARTIR DE BROCOLI CONGELADO**

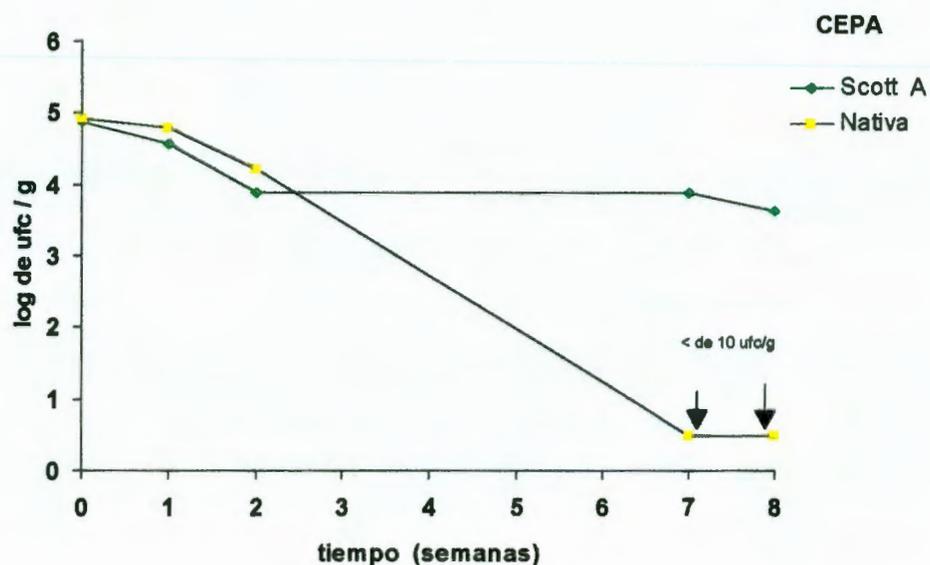
CEPA DE <i>L. monocytogenes</i>	ufc / g de brócoli (% de recuperación)		
	SIN REVITALIZACION	REVITALIZACION EN CST-EL (35°)	
		60 MIN	90 MIN
Scott A	47 500	75 000 (57.9)	175 000
Nativa	57 500	82 500 (43.5)	385 000

RECUPERACION DE DOS CEPAS DE *L. monocytogenes* A PARTIR DE BROCOLI ALMACENADO EN CONGELACION

Tabla 12

Tiempo de almacenamiento (semanas)	<i>L. monocytogenes</i> * / g de brócoli	
	Scott A	Nativa de brócoli
0	75 000	82 500
1	37 500	63 500
2	8 000	16 500
7	7 500	< 10
8	4 500	< 10

Gráfica 6



* revitalizadas 60 min en CST-EL

El tiempo cero corresponde al recuento realizado en el momento que el producto se congeló. La congelación inició con una carga de $\sim 10^6$ cel / g

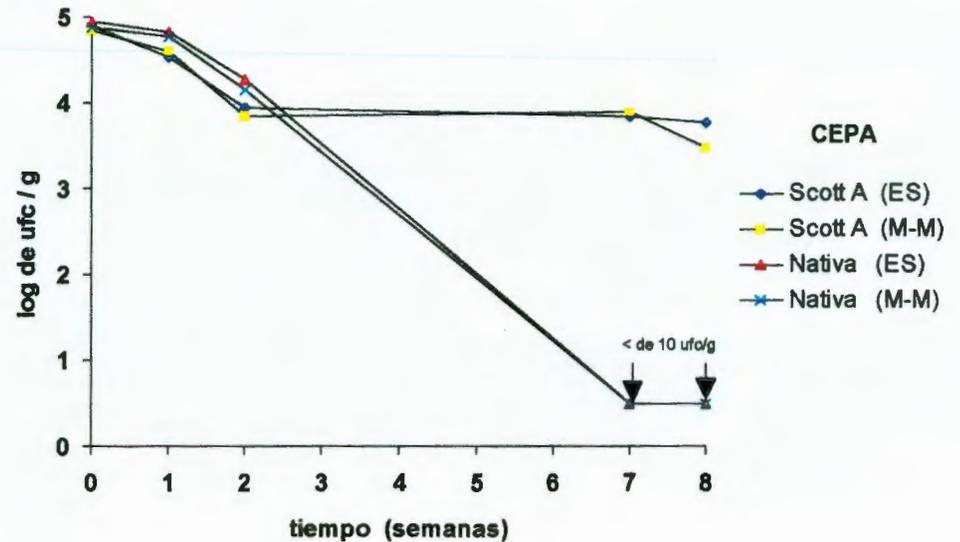
RECUPERACION DE DOS CEPAS DE *L. monocytogenes* A PARTIR DE BROCOLI ALMACENADO EN CONGELACION, UTILIZANDO LAS TECNICAS DE EXTENSION EN SUPERFICIE (ES) Y MILES-MISRA (M-M)

Tabla 13

Semanas de Almacenamiento	<i>L. monocytogenes</i> * / g de brócoli			
	Scott A		Nativa de brócoli	
	ES	M-M	ES	M-M
Inicial (sin congelar)	1 700 000		2 300 000	
0	80 000	70 000	90 000	75 000
1	35 000	40 000	67 000	60 000
2	9 000	7 000	19 000	14 000
7	7 000	8 000	< 10	< 10
8	6 000	3 000	< 10	< 10

* revitalizadas 60 min en CST-EL

Gráfica 7



3. Sanidad de la planta en base a organismos coliformes.

Se estimó que en principio, el sitio más crítico que favorecería la recontaminación, es el hidrofriador. El equipo implicado utiliza agua clorada (17 mg/L) que recircula durante ~4 h y se mantiene a 2-4°. Durante el enfriamiento hay turbulencias del agua y no es posible evitar el desprendimiento de porciones de brócoli de diversos tamaños a partir de diversas localidades del equipo. Estas se adhieren a las bandas, rodillos y paredes del tanque. Durante el lavado se retiran prácticamente todas las porciones visibles; permanecen, sin embargo, algunas pequeñas porciones residuales. El cloro del agua durante el procesamiento, tiene efecto germicida; no obstante, es posible la presencia de *Listeria* dentro de las porciones de brócoli hasta las cuales es inaccesible el cloro. Por otra parte, la baja temperatura prevalente no permite la actividad microbiana de una manera significativa. Lo que sí es factible, es la actividad del patógeno en residuos del vegetal adosado a partes del equipo en donde el agua no llega a contactar. Eventualmente, la porción contaminada se desprende, cae al agua y dispersa las bacterias que ahí se han multiplicado. Aún si el número de listerias es bajo por efecto de la dilución, puede ser suficiente para hacer positiva la prueba cualitativa, que como se ha dicho, es de muy alta sensibilidad: una célula viable en 25 g de alimento. El estudio que se comenta más adelante, proporciona una información cuantitativa de las listerias presentes en algunas muestras que han resultado positivas a la prueba de presencia ausencia.

Debido a la inevitable y constante introducción de porciones de brócoli al agua del hidrofriador es posible una progresiva pérdida de cloro activo. Los recuentos practicados cada hora durante 8 h, muestran la persistencia de coliformes con nivel inicial de 20 ufc/mL hasta 2 200 al término de la jornada (Tabla 14). Se observa un decremento acentuado entre las 5 y 6 h, coincidente con el cambio del agua en el sistema y nueva cloración. Pronto sin embargo, se presenta una nueva elevación en el número de coliformes, no obstante que la temperatura se mantiene muy baja. A 3° los tiempos de generación de las bacterias psicrótrofas no suelen ser menores de 6 h, y

TABLA 14

**COLIFORMES EN EL AGUA DE ENFRIAMIENTO DEL BROCOLI
DESPUES DEL PRECOCIDO DURANTE UNA JORNADA DE TRABAJO**

Horas de la jornada	Temperatura (°C)	mg/L de cloro residual (inactivado)	ufc/mL
Sin alimento 0	23	22	20
Después de iniciar el enfriamiento (con alimento) 1	3	38	200
2	3	44	900
3	2	23	1 600
5	3	23	700
6 *	3	38	100
7	3	30	1 700
8	3	37	2 200

* cambio de agua clorada en el enfriador

siempre y cuando los restantes factores ecológicos se mantengan cerca del óptimo, Petran y Zottola (102) reportan en 1989 el tiempo de generación de una cepa de *L. monocytogenes* Scott A de 33.5 h a 4° en CST a pH de 7; no es por supuesto, la situación en el agua del hidrogenfriador: aquí, la concentración de nutrientes es mínima y está presente un agente germicida. Parece más razonable considerar la introducción de porciones de brócoli que se hubieran adherido al equipo, y en las que se presentó la oportunidad de contaminación y eventual desarrollo de los coliformes. No se contó con facilidades para la determinación exacta de cloro activo en el agua; aparentemente la concentración era cercana a 20 mg/L (medición con colorímetro); el pH sin embargo, era de 7.6, lo que contribuye a explicar la presencia de esas bacterias. En efecto, es bien sabida la dependencia de un pH ácido que muestran los hipocloritos como germicidas (18, 51, 52, 62, 142).

Los niveles de tiempo y temperatura en los que se lleva a cabo la cocción del producto una vez lavado (92°, durante 5 min.), parecen suficientes para la inactivación total de la listeria. Se han realizado diversos estudios para evaluar su capacidad para sobrevivir al calor (23, 30, 31, 39, 49). La aplicación de tratamientos térmicos de cocción ordinarios, (60-70° actuales de calor) por algunos minutos, la inactivan. El valor D a 71.7° reportado por algunos autores es de 0.9 s, indicando que teóricamente, 15 log de *L. monocytogenes* por mililitro de leche cruda pueden ser inactivados si se calienta a 71.7 ° por 15 s (30, 31). La termotolerancia de *L. monocytogenes* puede ser inducida por una exposición subletal al calor previa. Por ejemplo, después de un choque térmico entre 42 y 48°, por tiempos de 5 a 60 min., el valor $D_{57.8^\circ}$ se incrementa de 1 a 3 minutos. Si la bacteria se expone previamente 5 min. a 48°, el valor $D_{57.8^\circ}$ es de 11.5 minutos; cuando se mantiene durante 60 min. a la misma temperatura, ese valor es de 9.2 minutos (33).

L. monocytogenes no es una bacteria esporulada; incluso no se reconoce como termodúrica (109). Sin embargo, por algún tiempo se consideró la posibilidad de que

sobreviviera a la pasteurización (48, 49, 90). Nuestros resultados son francamente concordantes con esa afirmación. En efecto, el germen, y de manera general las especies del género *Listeria*, sistemáticamente se encontraron ausentes en el producto muestreado a la salida del cocedor (Tabla 3, Gráfica 2). Es decir, las listerias provenientes del brócoli del campo, son inactivadas durante esa etapa del proceso de fabricación. La operación más efectiva para reducir la microflora en las verduras crudas es el precocido. La eficiencia del lavado tiene un efecto muy limitado. En estudios registrados en la literatura se ha encontrado *Listeria* en los diversos puntos de las plantas procesadoras, en el siguiente orden de prevalencia: pisos, drenajes, accesorios de limpieza como cepillo, esponjas, etc., producto y/o equipo de las áreas de lavado, alimento en contacto con las superficies, condensados, paredes y techos, y aire comprimido (14). La contaminación (de hecho, una recontaminación) por *L. monocytogenes* parece iniciarse a partir del precocido.

Lo más efectivo para reducir la microflora en las verduras crudas es este tratamiento (blanching). La cocción previa a la congelación destruye la mayoría de los microorganismos al mismo tiempo que inactiva muchas de las enzimas (29, 94). Así el precocido es el punto de control crítico en el procesamiento de verduras congeladas. Dado que destruye a la mayoría de los microorganismos contaminantes, la microflora de los productos empacados refleja la recontaminación después del precocido (29).

Es oportuno anotar que la recontaminación del germen al producto cocido, no se explica totalmente a través de una pasiva transferencia de microorganismos residuales en el equipo. Aparentemente en algunas localidades se presentan oportunidades para su multiplicación. Cuando la cepa Scott A de *L. monocytogenes* se inoculó en brócoli recién cocido y se almacenó a 22-25°, aumento su número poco más de 4 veces en sólo 2.5 h; el incremento en la cepa nativa fue de casi 14 veces (Tabla 9). Existen reportes en los que se consigna un tiempo de generación a 37° y pH 7 de 39.8 min. (102). Evidentemente el microorganismo encuentra en los residuos de brócoli del equipo un substrato muy favorable para desarrollar.

Los recuentos de coliformes obtenidos en 60 muestras confirman lo que hasta entonces se presentaba como una evidencia. Puede observarse (Tabla 15) que:

- a. dentro del hidrofriador se acumulan residuos de alimento con persistencia en algunos sitios, especialmente en la malla transportadora y su rodillo, y en ambas charolas (superior e inferior);
- b. el lavado de estos sitios no es del todo eficiente, de manera que se encuentran residuos de brócoli al término del tratamiento;
- c. la charola superior y la tapa albergan los mayores concentraciones de coliformes previo al lavado;
- d. la presencia de residuos de brócoli en la malla y el rodillo interfieren de manera notable con la eficiencia del tratamiento germicida;
- e. en general, aunque se alcanzan altos porcentos de reducción de la carga de coliformes, existen localidades en las cuales sobreviven estos microorganismos a la desinfección.

Simultáneamente se efectuaron otros estudios a base de coliformes para precisar mejor los posibles mecanismos que contribuyen a la contaminación del brócoli procesado.

En 57 muestras de brócoli en diferentes etapas del procesamiento, crudo, durante el proceso y ya congelado, los contenidos de coliformes más elevados se obtuvieron en este último (Tabla 16). Comparando las medianas, tanto el producto en proceso como el terminado muestran cargas de coliformes similares, pero considerablemente mayores que el producto crudo: 400-450 contra 3 ufc/g. Es notable que de 33 muestras de brócoli congelado ninguna estuvo exenta de coliformes, ausencia total que nunca ocurrió con el producto crudo o durante el proceso. Finalmente, el valor máximo de los recuentos también ocurre en brócoli congelado. Estos resultados ponen de manifiesto las oportunidades que se propician en la planta y que favorecen la contaminación cruzada o la recontaminación del brócoli durante su procesamiento.

TABLA 15

**REDUCCION DE COLIFORMES EN EL HIDROENFRIADOR
HIGIENIZADO CON TECNICA DE ESPUMA Y CLORACION (100 mg/L)**

MUESTRAS EXAMINADAS	LOCALIDAD	HIGIENIZACION				% DE REDUCCION
		ANTES (15:15)		DESPUES (7:15)		
		Residuos de brócoli	OC * (ufc/100cm ²)	Residuos de brócoli	OC * (ufc/100cm ²)	
8	Malla	+++	~ 500	+	~ 2 000	0
4	Rodillo malla	+++	~ 12 500	+	~ 12 500	0
5	Tubería	++	200	-	50	75
6	Soporte tubería	-	~ 5 500	-	< 10	100
10	Charola superior	+++	~ 200 000	-	~ 3 000	98.5
7	Tapa	+++	~ 300 000	+	100	99.9
9	Serpentín	-	~ 250	-	10	96
2	Puerta serpentín	-	50	-	< 10	100
6	Charola inferior	+++	~ 10 000	+	~ 5 000	50
3	Agua circulación	++	~ 3 000	-	150	95

Medias de los recuentos de las muestras analizadas

TABLA 16

**COLIFORMES EN BROCOLI EN 3
ETAPAS DE PROCESAMIENTO**

MEDIDA	CRUDO (n = 9)	PROCESO (n = 15)	CONGELADO (n = 33)
Mínimo	0*	0	80
Máximo	20 000	8 000	40 000
Media	2 300	1 400	2 900
Mediana	3	450	400

n = 57

* ufc/g

Los productos como el brócoli picado pueden ser más propensos a cuentas altas de mesófilos aerobios ya sea por las propiedades intrínsecas del vegetal o por los métodos de procesamiento (126).

Los enjuagues con agua remueven muchos de los organismos de la superficie, por ejemplo aquellos que no están protegidos por material mucilaginoso nativo de la planta (29). En la operación de lavado, el agua actúa como un agente humidificante y así, ayuda a mantener el contenido inicial de humedad del producto. El rociado automático, es un tipo de humidificación desarrollada para prevenir la deshidratación, extender la vida de anaquel y proveer una mejor apariencia de fresca (93). Mohl-Som y col. (93) en 1995, encontraron que el contenido de humedad disminuyó en las muestras de brócoli no rociadas, debido a una deshidratación causada por la baja humedad relativa en el cuarto frío donde se almacenan las verduras. Por otro lado las muestras de brócoli no rociadas pero almacenadas en un cuarto donde existe una unidad de rocío presentaron un contenido de humedad mayor que las que no se rociaron. Sin embargo, las muestras almacenadas en el cuarto frío con la unidad de rocío y que no fueron rociadas directamente presentaron un contenido de humedad menor que las muestras rociadas debido a que no recibieron directamente el tratamiento de rocío. Con respecto a las cuentas de microorganismos aerobios, coliformes, hongos y levaduras, las muestras de brócoli rociado y almacenado a temperaturas de refrigeración presentan una cuenta más baja de estos microorganismos comparada con los controles no rociados (93).

Las frutas y verduras pueden presentar un número elevado de microorganismos al tiempo de la cosecha. Varios procedimientos pueden remover o destruir la mayoría de los microorganismos (congelación, fermentación, secado) (29).

La eficiencia de la desinfección a base de cloro se aprecia en la distribución de los recuentos de coliformes en el equipo antes y después del tratamiento. El germicida se aplicó utilizando un sistema de espuma con cloro como principio activo. En 8 de 60 muestras el número de coliformes residuales fue mayor de $500 \text{ ufc}/100^2 \text{ cm}^2$ (las 52

restantes mostraron <10 ufc), en tanto que previo al tratamiento eran 38 de 60 con ese contenido (Tabla 17).

Para ampliar la información sobre la participación del hidrofriador como fuente de contaminación en el proceso, se muestrearon periódicamente tres parámetros que pueden tener influencia decisiva en la microbiología del brócoli precocido y congelado: la temperatura, la concentración de cloro residual y las ufc de coliformes en el agua dentro del equipo. Se puede advertir (Tabla 14) que ya al cabo de 1 h de inicio de las actividades, la temperatura ha descendido a 3° y así se mantiene durante una jornada de trabajo; la concentración de cloro activo oscila entre 22 y 44 mg/L. Bajo estas condiciones siempre se detectaron coliformes; desde el inicio (cuando aún no circulaba alimento) la concentración era de 20 ufc/mL. El número se incrementó hasta 1 600 /mL a las 3 h, disminuyó con el cambio de agua y volvió a incrementarse. Estos incrementos, como expresión de una multiplicación activa de los coliformes, resultan incompatibles con las condiciones prevalentes en el agua: una muy baja temperatura y una concentración considerable de germicida. Aún bacterias con claro potencial psicrótrofo muestran tiempos de generación de 12 o más horas a esa temperatura (102). Hay que agregar, que el medio involucrado contiene un germicida. Por esta razón, estimamos que el incremento en el contenido de coliformes tenga más bien su origen en una contaminación pasiva dentro del hidrofriador, a partir de los residuos de alimento ya referido. Los coliformes podrían permanecer protegidos en el tejido del brócoli contra la acción germicida del hipoclorito.

Otro estudio permitió fundamentar estas consideraciones. A lo largo de 8 horas se muestrearon residuos de brócoli por sextuplicado dentro del hidrofriador. Estos residuos se encuentran parcialmente adheridos a la banda transportadora; la concentración de coliformes mostró cierta tendencia al incremento conforme el tiempo transcurría (Tabla 18). Una descripción detallada de las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el enfriamiento muestra los riesgos no sólo de recontaminación del producto, sino el de multiplicación de los coliformes y de la propia *L. monocytogenes*

TABLA 17

COLIFORMES* EN EL EQUIPO ANTES Y DESPUES DE HIGIENIZAR CON TECNICA DE ESPUMA Y CLORACION EN EL HIDROENFRIADOR

LIMITES	PREVIO	POSTERIOR
n	60	60
0*	7	19
< 10	15	33
> 500-1 000	10	2
> 1 000	28	6

* ufc/100 cm²

La mediana de las 60 muestras antes de higienizar fue de 510 ufc/cm², y después de higienizar, de 20 ufc/cm².

TABLA 18

**ORGANISMOS COLIFORMES EN RESIDUOS DE BROCOLI
OBTENIDOS DURANTE 8 HORAS EN 3 DISTINTAS LOCALIZACIONES
DE LA BANDA TRANSPORTADORA DEL HIDROENFRIADOR**

LOCALIZACION DEL MUESTREO	ufc / trozo							
	tiempo (horas)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ANTERIOR (INICIO)	170	50	230	170	4 200	600	750	500
	120	900	470	180	370	280	1 400	10 000
CENTRO	80	30	40	70	10	120	20	120
	510	20	140	50	40	150	190	300
POSTERIOR (SALIDA)	100	120	100	40	2 000	600	1 200	1 000
	230	40	120	800	2 000	340	1 200	1 000

en esta etapa del proceso. El brócoli cocido y preenfriado ($\sim 30^\circ$) ingresa al centro de la banda del hidrogenfriador. La banda forma filas de cuadros de aproximadamente 1 cm que alternan con filas de 0.5 cm de lado. De la parte superior recibe el impacto de chorros de agua que ha sido enfriada dentro del propio hidrogenfriador. Es posible que algunas pequeña porciones del brócoli se desprendan del centro de la banda hacia el borde y permanezcan adheridos por varias horas. Ahí no se encuentran tan expuestos al impacto de agua fría. Su temperatura interior podría elevarse sensiblemente y propiciar un desarrollo de las bacterias mencionadas. Eventualmente estas porciones con su carga microbiana puede caer al fondo del tanque donde se colecta el agua antes de ser bombeada a la parte superior del equipo, donde se enfría y cae sobre nuevas piezas de brócoli. Los microorganismos se dispersarán en el agua y recontaminarán el producto. Este evento puede ocurrir muy esporádicamente, en pocas ocasiones a lo largo de una jornada de trabajo. Otras porciones de brócoli escasamente o no contaminadas también alcanzan el fondo del tanque, sin consecuencias para la microbiología del alimento que se encuentra en proceso de enfriamiento. Los eventos peligrosos pueden configurarse de manera que en un momento dado el agua que cae sobre las piezas grandes que se van a congelar, aporte suficientes microorganismos para explicar los resultados positivos a *L. monocytogenes* que hemos detectado. La contaminación es pues, intermitente, y sólo una proporción de las unidades examinadas resultará positiva al examen del patógeno. Esta es la situación que se ilustra en la Tabla 19. Sólo se detectó en una de las ocho ocasiones en que fue investigado.

La conclusión pertinente es que el sistema de hidrogenfriador, al menos como se encuentra diseñado en la planta, es inadecuado para prevenir de manera segura la recontaminación del brócoli después de haber sido cocido. Las porciones contaminadas pueden a su vez contaminar la banda que transporta al producto hasta la zona de empaque o del congelador a granel; el problema de la recontaminación del brócoli enfriado se extendería hasta estos puntos. No se trata en principio, como se ve,

TABLA 19

***L. monocytogenes* EN RESIDUOS DE BROCOLI OBTENIDOS DURANTE 8 HORAS EN 3 DISTINTAS LOCALIZACIONES DE LA BANDA TRANSPORTADORA DEL HIDROENFRIADOR**

LOCALIZACION DEL MUESTREO	ufc / trozo							
	tiempo (horas)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ANTERIOR (INICIO)	+	-	-	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	-	-	-
CENTRO	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
POSTERIOR (SALIDA)	+	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-

de una deficiencia en las prácticas de saneamiento del equipo, las que obviamente requieren mayor escrupulosidad y monitoreo para mantener bajo control los riesgos de contaminación. El empleo de un sistema de enfriamiento a base aire frío, junto con un eficiente programa de higienización, parece muy sugestivo.

3.1 Enfriamiento con aire

La planta tuvo oportunidad de aplicar el sistema de enfriado con aire por algún tiempo. En la Tabla 20 se aprecia una diferencia notable en las tasas de positividad a *L. monocytogenes* cuando se comparan los dos sistemas de enfriamiento, con agua y con aire ($p < 0.05$). Sin embargo, es notable que no se consigue una erradicación del germen en el producto terminado: de 30 exámenes de productos tratados con aire, en tres ocasiones persistía el patógeno. Como se anotó, el problema de la contaminación no se restringe al hidrogenfriador si bien constituye la fuente principal. De cualquier manera la alternativa del enfriador con aire es promisorio; es posible mejorar todavía más el índice de remoción de *L. monocytogenes* en el brócoli congelado a través de una mayor experiencia en la instrumentación del enfriador con aire, complementado con la sanidad y adecuado manejo sanitario del producto hasta la congelación.

4. Susceptibilidad de *L. monocytogenes* a germicidas de uso común en plantas de alimentos.

El programa de higienización debe incluir limpieza e higienización regular de las superficies que entran en contacto con el producto utilizando un sanitizante apropiado. También se sugiere que el agua que entre en contacto con el producto este clorada, dependiendo del tipo de producto que vaya a ser procesado y si el agua entre en contacto con el producto, es diseñado meramente para reducir la carga bacteriana en el agua, o para sanitizar las superficies. Dependiendo también de los propósitos, el contenido de cloro en el agua puede variar desde 5 hasta 200 mg/L (14).

TABLA 20

**DISTRIBUCION DE *Listeria* spp. Y *L. monocytogenes* EN
BROCOLI PRECOCIDO Y CONGELADO,
ENFRIANDO CON AGUA Y CON AIRE**

ENFRIAMIENTO	MUESTRAS		
	Examinadas	Positivas a <i>Listeria</i> spp.	Positivas a <i>L. monocytogenes</i> (%)
AGUA	97	50	42 (43)
AIRE	30	3	3 (10)

La tasa de recuperación de *Listeria* de las plantas con un promedio de higienización superior y excelentes o moderados programas de control de la contaminación del medio ambiente fue de 6.8%, mientras que la recuperación en las plantas con un promedio de higienización bajo y pobres o ausentes programas de control de la contaminación del medio ambiente fue de 27.5% (122).

Un monitoreo sistemático para *L. monocytogenes* en la producción puede ayudar a identificar la fuentes de riesgo, y así facilitar la eliminación del organismo de las plantas procesadoras (122).

Tres eventos son determinantes en la presencia de *L. monocytogenes* en el brócoli precocido y congelado: propiciar la contaminación del producto una vez cocido; favorecer su multiplicación en cualquier material que de manera directa o indirecta llegue a estar en contacto con el alimento; la sobrevivencia del microorganismo en las etapas diseñadas (o potencialmente activas) para su destrucción, sea en el brócoli o en el equipo. Dentro de este último renglón, los procesos de sanidad deben ser cuidadosamente concebidos, aplicados, monitoreados y evaluados. Una fuente importante de contaminación en las verduras congeladas es el equipo. Las unidades que han sido especialmente problema son, los picadores, rebanadores bandas transportadoras y de inspección y maquinas llenadoras. Las superficies de algunas de estas unidades son difíciles de alcanzar para una adecuada higienización (29). De alguna manera, la dificultad en el control de la contaminación post-precocido está relacionada con el tipo de verdura; por ejemplo, con el maíz se liberan grandes cantidades de almidón, mientras que mínimas cantidades de sólidos solubles se liberan durante el procesamiento de ejotes y chícharos (29). Durante el procesamiento de brócoli observamos la liberación de una gran cantidad de sólidos después del precocido.

En general, esta bacteria no se considera especialmente resistente a muchos de los germicidas que se utilizan comúnmente en la industria láctea, a las concentraciones recomendadas. *L. monocytogenes* parece sensible a bajas concentraciones de cloro (50

mg/L), (26). Sin embargo, Best y col. (18) encontraron que en presencia de materia orgánica (suero y leche parcialmente descremada) el efecto germicida disminuía apreciablemente en la mayoría de 14 formulaciones que probaron. Tan solo un yodóforo, el gluconato de clorhexidina y el glutaraldehído, fueron efectivos en presencia de suero, aunque no en presencia de la leche. Por su parte, sólo el dicloisocianurato de sodio fue efectivo en presencia de leche. Al sumergir coles de Bruselas en una solución de cloro conteniendo 200 mg/L se redujo la población solamente 2 log (cerca del 99%). Sin embargo, mucha de la reducción, aparentemente fue resultado de la pérdida de células por arrastre mecánico (26).

Un problema frecuente en la evaluación de germicidas que se van a aplicar sobre superficies inertes, es la inactivación de una proporción importante del inóculo del germen indicador que se deposita sobre la superficie, previo al ensayo del germicida. Este problema lo observamos cuando utilizamos placas de acero inoxidable inoculadas con suspensiones de *L. monocytogenes* en diluyente de peptona. Mientras el inóculo no seca completamente sobre las placas, la viabilidad se mantiene o apenas sufre una pequeña merma; una vez que la humedad visible ha desaparecido (aproximadamente a los 90 min.), la pérdida de células viables es notoria, más notablemente en el caso de la *E. coli* suspendida en diluyente de peptona. El uso de CST-EL corrige este problema (Tabla 21, Gráfica 8).

En realidad el empleo de un agente portador de la listeria, que contenga materia orgánica, no debe ser objetable, tomando en cuenta el efecto protector referido. Tal suele ser la condición en la que se encuentran los microorganismos que se desean inactivar en el equipo que se va a sanear en una planta procesadora. Una concentración de hipoclorito de sodio hasta de 150 mg/L (pH 7.0) durante 5 min., no redujo o escasamente, la población de listerias viables en las láminas (Tabla 22, Gráfica 9). Best y col. (18) obtuvieron una reducción de 5-6 log el número de células viables con la cepa LCDC 88-702 de *L. monocytogenes* ante 60 mg/L de hipoclorito cuando el germen se encontraba suspendido en CST, y menor de 1 log suspendido en suero de

RECUPERACION DE *L. monocytogenes* Y *E. coli* INOCULADAS CON DOS VEHICULOS EN LAMINAS DE ACERO INOXIDABLE

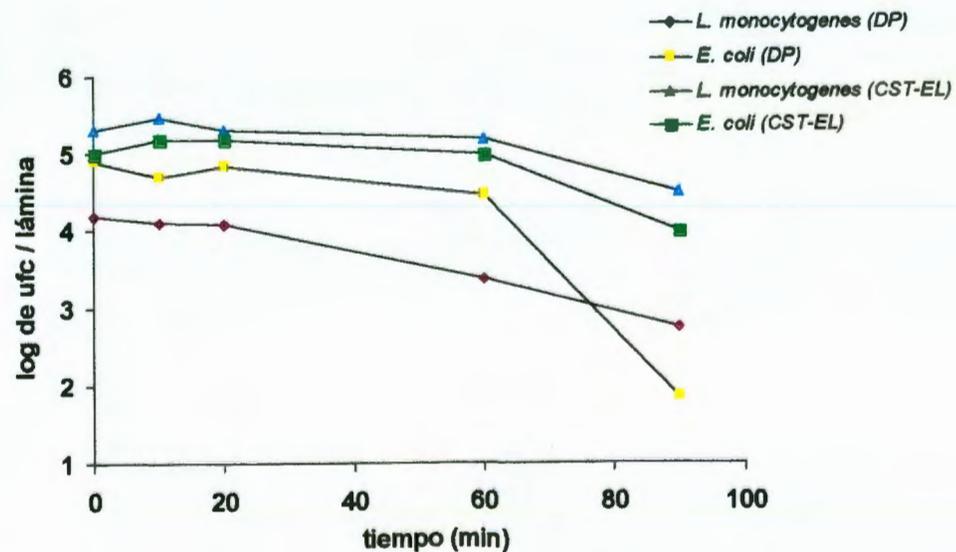
Tabla 21

Tiempo de secado (min)	VEHICULO DEL MICROORGANISMO			
	DILUYENTE DE PEPTONA (DP)		CST-EL (CST-EL)	
	<i>L. monocytogenes</i> ufc / lámina	<i>E. coli</i> ufc / lámina	<i>L. monocytogenes</i> ufc / lámina	<i>E. coli</i> ufc / lámina
0	1.6×10^4	8.0×10^4	2.0×10^5	1.0×10^5
10	1.3×10^4	5.0×10^4	3.0×10^5	1.5×10^5
20	1.2×10^4	7.0×10^4	2.0×10^5	1.5×10^5
60	2.5×10^3	3.0×10^4	1.6×10^5	1.0×10^5
90*	5.7×10^2	70	3.3×10^4	1.0×10^4

* sequedad total

Inóculo: $\sim 10^5$ ufc / 0.1 mL de vehículo y secadas en flujo laminar

Gráfica 8



SOBREVIVENCIA DE *L. monocytogenes* NATIVA A HIPOCLORITO DE SODIO Y CITRICIDIN^{MR} SOBRE SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE

Tabla 22

TRATAMIENTO	ufc / lámina	% de reducción
SECADO EN FLUJO LAMINAR	1.0×10^7	
ENGUAJE EN AGUA ESTERIL	1.7×10^6	
HClO 50 mg/L	1.8×10^5	89.41
HClO 100 mg/L	1.8×10^5	89.41
HClO 150 mg/L	6.0×10^5	64.71
HClO 200 mg/L	< 100	99.99
Citricidin 50 mg/L	2.6×10^5	84.71
Citricidin 100 mg/L	2.7×10^4	98.41
Citricidin 200 mg/L	< 100	99.99

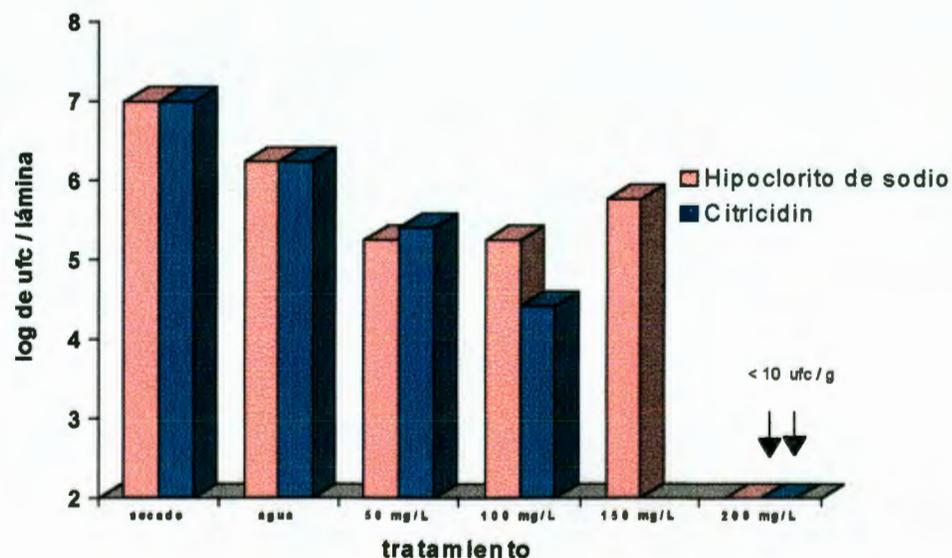
* medias de duplicados

Inóculo: $\sim 10^8$ ufc / 0.1 mL de vehículo (CST-EL)

Tiempo de contacto: Hipoclorito : 5 min

Citricidin^{MR} : 3 min

Gráfica 9



leche, usando una técnica similar de evaluación del germicida a la que nosotros utilizamos. Después de 5 min. de contacto, la reducción en el número de listerias recuperadas fue al menos de 5 log, con 200 mg/L de hipoclorito. Las diferencias observadas pueden explicarse en términos de la cepa utilizada en los ensayos. Best y col. (18) usaron una cepa de colección, en tanto que nosotros empleamos una cepa recién aislada de brócoli en la planta. Hay que agregar que además nosotros inactivamos el hipoclorito al término del período de tratamiento; los autores mencionados intentaron detener el efecto del germicida diluyéndolo en solución salina, mientras que nosotros lo inactivamos con tiosulfato de sodio.

El Citridin^{MR} mostró una eficiencia mayor a la del hipoclorito, considerando que la disminución del número de células viables fue similar, pero requirió menos tiempo (3 min. contra 5 min. del hipoclorito). Con 50 mg/L la reducción fue cercana a 2 log; con 100 mg/L, casi 3, y con 200 mg/L la misma reducción que con hipoclorito a 200 mg/L (al menos 5 log). Debe agregarse que el tiempo de contacto utilizado entre las listerias en las láminas contaminadas y el germicida, fue menor (3 min. contra 5 min.) que el usado con el hipoclorito (Tabla 22, Gráfica 9).

El hipoclorito es un germicida de amplia aceptación en la industria alimentaria. Con frecuencia se alterna con otros como los yodóforos y las sales cuaternarias de amonio. Los hipocloritos son desinfectantes activos contra un amplio espectro de organismos; no muestran toxicidad al humano a bajas concentraciones. Debido a que son de los más económicos, se emplean ampliamente en la industria de los alimentos. La principal desventaja es que la humedad, el calor, la luz, y sobre todo la presencia de materia orgánica, incrementan la tasa de pérdida de cloro libre (142). Es un oxidante fuerte que actúa a nivel de las membranas y otros constituyentes celulares (79). Sin embargo, su efectividad es muy dependiente del pH, y es antagonizada por la presencia de materia orgánica (18, 51, 62, 109, 142). El indicador generalmente empleado para evaluar la eficiencia de los germicidas (a menos que se tenga interés especial en un microorganismo específico), son los coliformes. El hallazgo de *L. monocytogenes* en el

producto terminado, habiendo sido inactivada en la etapa de cocción, sugiere una contaminación ulterior. Una fuente de contaminación relevante es el equipo que entra en contacto directo con el alimento, desde el preenfriador, hasta el mismo congelador (cuando este se congela a granel). Resulta de interés en consecuencia, muestrear con algún detalle el hidrofriador, como parte del proceso que teórica y prácticamente, parece ser el sitio crítico en la recontaminación del brócoli.

5. Cuantificación del contenido de *L. monocytogenes* en muestras de producto precocido y congelado. NMP y norma

Como se indicó en la introducción, generalmente se acepta que la concentración de *L. monocytogenes* en los alimentos no es elevada, probablemente menor a 100/g (24, 89, 103). También se reconoce que su distribución no suele ser homogénea; ciertas porciones pueden estar libres del germen, en tanto que otras, especialmente si se ha favorecido su multiplicación, podrían albergar miles de células. La técnica de elección para el recuento de este patógeno en el producto terminado es la del número más probable. Aunque más laboriosa y lenta, permite la recuperación de la condición de estrés que las bacterias han sufrido como consecuencia de la congelación; se explora, además, un mayor volumen de muestra. En 7 muestras que habían resultado positivas a la prueba cualitativa en porciones de 25 g, los límites detectados oscilaron entre <0.03 y 2 células /g, la mayor parte de las veces, 0.04 /g (Tabla 23). Este último valor corresponde precisamente al límite de la prueba cualitativa que analiza 25 g de muestra. La cifra de <0.03 en muestras en las que se había detectado la presencia del patógeno, es explicable tanto en función de su desigual distribución en el producto, como de su escaso número. En realidad se trata de cifras muy reducidas, cuyas implicaciones como riesgo a la salud son también mínimas. Países distintos a Estados Unidos (por ejemplo de Europa y Canadá), no muestran la severidad de la norma para la aceptación de un alimento, es decir, ausencia de *L. monocytogenes* en porciones de 25 g de alimento (54, 77). En México, tradicionalmente alineado a la normatividad de

TABLA 23

**CUANTIFICACION DEL CONTENIDO DE *Listeria monocytogenes*
EN MUESTRAS DE PRODUCTO TERMINADO POSITIVAS
A LA PRUEBA CUALITATIVA**

MUESTRA	NMP / g	
	1 SEMANA DE CONGELACION	2 SEMANAS DE CONGELACION
1	1.50	0.04
2	2.00	0.04
3	0.40	< 0.03
4	0.23	0.09
5	< 0.03	0.04
6	0.09	< 0.03
7	0.23	< 0.03

Norteamérica, también se sigue esta norma (3). La protección directa a la salud a base de asegurar la ausencia de la listeria en el alimento, tropieza con algunas dificultades. Por una parte el desconocimiento de la dosis letal mínima, o al menos de la dosis mínima infecciosa, del microorganismo. Un muestreo de 3-clases ha sido recomendado por la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) para compensar las amplias variaciones de los recuentos de mesófilos aerobios entre las muestras (126). La más reciente revisión de vegetales precocidos y congelados menciona 5 empaques (n) por lote examinado. El máximo aceptable de mesófilos aerobios (m) es $10^5/g$. El lote no es rechazado, sin embargo, si no más de tres de los empaques (c) exceden este esquema. (El plan original había estipulado $m=10^4/g$). Ninguna de las 5 muestras puede tener una cuenta de mesófilos aerobios de $10^6/g$ o más. Desde una perspectiva esencialmente preventiva, podría considerarse objetable la presencia de este patógeno en términos, no de un riesgo actual, al contrario de lo que ocurre con la presencia de *Salmonella* en un alimento. La condena del alimento en el que se compruebe la presencia de *L. monocytogenes* en porciones de 25 g, podría entenderse entonces, y tendría valor práctico, como un rechazo a productos en los que se ha propiciado su recontaminación después de haber sido expuesto a tratamiento que aseguran su inactivación. En este sentido la norma tendría racionalidad, aplicada en alimentos listos para ser consumidos, y que han recibido dicho tratamiento. Lo que se condenaría en principio, sería el descuido que conduce a la recontaminación, sin pretender proteger de manera directa la salud del consumidor ante un riesgo actual (la presencia de un patógeno en el alimento). En otras palabras, la interpretación del hallazgo de *L. monocytogenes* se haría en términos de un microorganismo indicador.

VII. CONCLUSIONES

1. El género *Listeria*, y en particular la especie *L. monocytogenes*, se encuentra presente, aunque en baja proporción (11 y 3% respectivamente), en brócoli recién cosechado.
2. Durante el procesamiento del brócoli precocido y congelado hay una inactivación total del microorganismo seguido de una recontaminación, de manera que el producto terminado muestra una positividad a *L. monocytogenes* de 35%.
3. Mientras que las especies predominantes en el producto crudo son distintas a *L. monocytogenes* (3% positivas de esta última, contra 11% para todas las especies de *Listeria*), en el producto terminado la diferencia es mucho menos notable, las cifras respectivas son 35 y 42%. La especie patógena exhibe así, una mayor capacidad de sobrevivencia a los germicidas y/o a la congelación que se aplican durante el procesamiento, o una mayor capacidad de multiplicación en el brócoli, bajo las condiciones de operación de la planta.
4. El brócoli cocido constituye un substrato favorable para la multiplicación de *L. monocytogenes*.
5. La congelación y almacenamiento del brócoli a -16° tienden a disminuir el contenido de *L. monocytogenes* viables.
6. Dos cepas de *L. monocytogenes*, la cepa Scott A, aislada de un caso humano de listeriosis, y una cepa nativa del brócoli (aislada en nuestro laboratorio), mostraron comportamiento distinto en este alimento: la primera creció menos activamente en el brócoli cocido, pero mostró una sobrevivencia mayor en el producto mantenido en congelación.
7. La contaminación más relevante de *Listeria* ocurre en la etapa del hidrofriado; las condiciones de sanidad del equipo es un factor adicional como determinante de la presencia del patógeno en el alimento procesado.

8. Ni el empleo de agua a 3° para el enfriamiento, ni el mantenimiento de 17 mg/L de cloro activo en el agua de enfriamiento, permite eliminar al patógeno en el brócoli precocido y congelado.
9. La sustitución del hidrogenfriador por un sistema de enfriamiento con aire, reduce considerablemente el problema de la recontaminación del brócoli previo a la congelación.
10. La aplicación de 200 mg/L de cloro activo (a partir de hipoclorito de sodio) durante 5 min., o de 200 mg/L de Citricidin^{MR} durante 3 min., disminuye en 5 log el número de células viables de una cepa de *L. monocytogenes* aislada de brócoli, inoculada sobre la superficie de acero inoxidable.
11. El número de células de *L. monocytogenes* presentes en las muestras de brócoli que resultan positivas a la prueba cualitativa en porciones de 25 g, es más bien bajo; osciló entre <0.03 y 2.0 /g, la mayor parte de las veces 0.04 /g.
12. Un programa de higienización del equipo, completo, sistemático y regularmente verificado especialmente después de la etapa de cocción, integrado a prácticas sanitarias de operación, es un complemento esencial, pero seguro, instrumentado en principio dentro de un sistema de ARPCC, para satisfacer la norma de ausencia de *L. monocytogenes* en porciones de 25 g de brócoli precocido y congelado.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Adams, C.E. 1994. Industry perspectives on *Listeria monocytogenes* in foods: Retail distribution. Dairy Food Environ. Sanitation. 14:144-145.
2. Adams, M.R., Hartey, A.D. and Cox, L.J. 1989. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. Food Microbiol. 6:69-77.
3. Asociación de Procesadores de Frutas y Verduras en General, A.C. Irapuato, México. Folleto informativo.
4. Assanta Mafu, A., Roy, D., Goulet, J. and Magny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. J. Food Prot. 53:742-746.
5. Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G. and Flandrois, J.P. 1996. The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. Int. J. Food. Microbiol. 29:201-211.
6. Baker, J.M., Griffiths, M.W. and Collins-Thompson, D.L. 1992. Bacterial bioluminescence: Applications in food microbiology. J. Food Prot. 55:62-70.
7. Bank, J., Marth, E.H., 1990. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In Foodborne Diseases. Cliver, D.O. (Ed.). Academic Press Inc. San Diego California, U.S.A. pp. 247-257.
8. Barza, M. 1985. Listeriosis and milk. N. Engl. J. Med. 312:438-440.
9. Basic-Zaninovic, T., Papes, D. and Franekic, J. 1991. Cycloheximide genotoxicity in vitro and in vivo test systems. Mutat. Res. 263:203-210. (citado en la referencia 28).
10. Bautista, D.A., McIntyre, L., Laleye, L. and Griffiths, M.W. 1992. The application of ATP bioluminescence for assesment of milk quality and factory hygiene. J. Rapid Meth. Autom. Microbiol. 1:179-193.
11. Bean, N.H., Griffin, P.M., Goulding, J.S. and Ivey, C.B. 1990 Foodborne disease outbreak, 5-year summary, 1983-1987. J. Food Prot. 53:711-728.
12. Bean, N.H., Goulding, J.S., Matthew, T.D. and Angulo, F.J. 1997. Surveillace for foodborne disease outbreaks-United States, 1988-1992. J. Food Prot. 60:1265-1286.
13. Beckers, H.J. 1988. Incidence of foodborne disease in the Neetherlands : Annual summary 1982 and an overview from 1979 to 1982. J. Food Prot. 53:804-817.

14. Bernard, D. 1994. Industry perspectives on *Listeria monocytogenes* in foods: Manufacturing and processing. Dairy Food Environ. Sanitation. 14:140-143.
15. Berrang, M.E., Brackett, R.E. and Beuchat, L.R. 1988. Abstract of papers presented at the seventy-fifth annual meeting of the IAMFES. The effects of modified atmosphere storage on growth of *L. monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* on fresh broccoli. J. Food Prot. 51:822-834 (828).
16. Berrang, M.E., Brackett, R.E. and Beuchat, L.R. 1989. Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. Appl. Environ. Microbiol. 55:2167-2171.
17. Berrang, M.E., Brackett, R.E. and Beuchat, L.R. 1989. Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. J. Food Prot. 52:702-705.
18. Best, M., Kennedy, M.E. and Coates, F. 1990. Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp. Appl. Environ. Microbiol. 56:377-380.
19. Beuchat, L.R. 1976. Survey of media for the resuscitation of heat-stressed *Vibrio parahaemolyticus*. J. Appl. Bacteriol. 40:53-60.
20. Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. 1990. Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 56:1734-1742.
21. Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. 1990. Survival and growth of *L. monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. J. Food Sci. 55:755-758.
22. Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. Appl. Environ. Microbiol. 57:1367-1371.
23. Beuchat, L.R., Brackett, R.E., Hao, D.Y-Y. and Conner, D.E. 1986. Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. Can. J. Microbiol. 32:791-795.
24. Blywick-Mckennal, D.N., and Schaffner, D.W. 1994. Prediction of Most Probable Number of *Listeria monocytogenes* using a generalized linear model and a modified FDA *Listeria* isolation method. J. Food Prot. 57:1052-1056.
25. Boli, H.R., Stafford, A.E., King, A.D. and Huxsoll, C.C. 1977. Factors affecting the storage stability of shredded lettuce. J. Food Sci. 42:1319-1321.
26. Brackett, R.E. 1987. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 50:999-1003.
27. Brackett, R.E. 1988. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. Food Technol. 42 (4): 162-164.

28. Brackett, R.E. 1997. Fruits, Vegetables, and Grains. In Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (Eds.) ASM-Press, Washington, D.C.
29. Brackett, R.E. and Splittstoesser, D.F. 1992. Fruits and vegetables. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C. and Solittstoesser, D.F. (Eds.). 3rd Edition. American Public Health Association. Washington, D.C., U.S.A. pp. 919-927
30. Bradshaw, J.G., Peeler, J.T., Corwin, J.J., Hunt, J.M., Tierney, J.T., Larkin, E.P. and Twedt, R.M. 1985. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. J. Food Prot. 48:743-745.
31. Bradshaw, J.G., Peeler, J.T., Corwin, J.J., Hunt, J.M. and Twedt, R.M. 1987. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products. J. Food Prot. 50:543-544.
32. Bubert, A., Kohler, S., and Goebel, W. 1992. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus-and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerasa chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58:2625-2632.
33. Bunning, V.K., Crawford, R.G., Tierney, J.T. and Peeler, J.T. 1990. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock. Appl. Environ. Microbiol. 56:3216-3219.
34. Bunning, V.K., Donnelly, C.W., Peeler, J.T., Briggs, E.H., Brodshaw, J.G., Crawford, R.G., Beliveau, C.M., and Tierney, J.T. 1988. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes. Appl. Environ. Microbiol. 54:364-370.
35. Carpenter, S.L. and Harrison, M.A. 1989. Fate of small populations of *Listeria monocytogenes* on poultry processed using moist heat. J. Food Prot. 52:768-770.
36. Case, R.A., Bradley, Jr., R.L. and Williams, R.R. 1985. Chemical and physical methods. In: Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Richardson, G.H. (Ed.) 15th American Public Health Association, Washington, D.C. pp. 344-346.
37. Cassidy, P.K. and Brackett, R.E. 1989. Methods and media to isolate and enumerate *Listeria monocytogenes*: A Review. J. Food Prot. 52:207-214.
38. Citricidin 2000. Folleto informativo del fabricante. México. ()

39. Conner, D.E., Brackett, R.E. and Beuchat, L.R. 1986. Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:59-63.
40. Cox, L.J., Kleiss, T., Cordier, J.L., Cordellana, C., Konkel, P., Pedrazzini, C. Beumer, R and Siebenga, A. 1989. *Listeria* spp. in food processing non-food and domestic environments. *Food Microbiol.* 6:49-61.
41. Datta, A.R., Moore, M.A.A., Wentz, B.A. and Lane, J. 1993. Identification and enumeration of *Listeria monocytogenes* by nonradioactive DNA probe colony hibridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:144-149.
42. Donker-Voet, J. 1963. My view on the epidemiology of *Listeria* infections, p. 133-139. In. M. L. Gray (Ed.), Second symposium on listeric infection. Montana State College, Bozeman. (citado en la referencia 138).
43. Donnelly, C.W. 1994. *Listeria monocytogenes*. In *Foodborne Disease Handbook*. Vol. I. Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murell, K.D. and Cliver, D.O. (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A. pp. 215-252.
44. Donnelly, C.W., Brackett, R.E., Doores, S., Lee, W.H. and Lovett J., 1992. *Listeria*. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Vanderzant, C. and Solittstoesser, D.F. (Eds.). 3rd Edition. American Public Health Association. Washington, D.C., U.S.A. pp. 637-663.
45. Donnelly, C.W. and Briggs, E.H. 1986. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J.Food Prot.* 49:994-998.
46. Doucet-Populaire, F., Trieu-Cuot, P., Dosbaa, I., Andremont, A. and Courvalin, P. 1991. Inducible transfer of conjugative transposon Tn 1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:185-187. (citado en la referencia 72)
47. Doyle, M.P. 1992. A new generation of foodborne pathogens. *Dairy Food Environ. Sanit.* 12:490-493.
48. Doyle, M.P. 1988. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. *Food Technol.* 42(4):169-171.
49. Doyle, M.P., Glass, K.A., Beery, J.T., Garcia, G.A., Pollard, D. and Schultz, R.D. 1987. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperatures, short-time pasteurization. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1433-1438.

50. El-Kest, S.E. and Marth, E.H. 1992. Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: A Review. J. Food Prot. 55:639-648.
51. El-Kest, S.E. and Marth, E.H. 1988. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by chlorine. J. Food Prot. 51:520-524.
52. El-Kest, S.E. and Marth, E.H. 1988. Temperature, pH, and Strain of Pathogen as Factors Affecting Inactivation of *Listeria monocytogenes* by Chlorine. J. Food Prot. 51:622-625.
53. Epidémie de listériose a Iysovar 2671-108-312 en France. 1993 - Résultats préliminaires de l'enquete épidémiologique coordonnée par le Réseau National de Santé Publique. Bull. Epidémiol. Hebdom. 34:157-158. (citado en la referencia 72).
54. Europe Scientific Committee on Microbiology. 1995. A scientific basis for regulations on pathogenic microorganisms in foods. Dairy Food Environm. Sanit. 15:2-301-308.
55. Farber, J.M., Sanders, G.W. and Johnston. 1989. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. J. Food Prot. 52:456-458.
56. Fernández Escartín, E. 1997. Identification and prevention of microbial risks in foods: The HACCP approach and priorities in Mexico. Environ. Health. 60: 40-42.
57. Fernández Escartín, E. 1981. Microbiología Sanitaria del Agua y Alimentos. Vol I Ed. Universidad de Guadalajara.
58. Fleming, D.W., Coch, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V. and Reingold, A.L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of Listeriosis. N. Engl. J. Med. 312:404-407.
59. Foegeding, P.M. and Ray, B. 1992. Repair and detection of injured microorganisms. In Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C. and Solittstoesser, D.F. (Eds.). 3rd Edition. American Public Health Association. Washington, D.C., U.S.A. pp. 121-134.
60. Food and Drug Administration. 1992. Bacteriological Analytical Manual. 7th Ed. AOAC. International.
61. Gaillar, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. and Sansonetti, P. 1987. Penetration of *Listeria monocytogenes* into the host: A crucial step of the infectious process. Ann. Microbiol. 138:259-264. (citado en la referencia 121)

62. García-Gimeno, R.M., Zurera-Cosano, G., Amayo-López, M. 1996. Incidence, survival and growth of *Listeria monocytogenes* in ready-to-use mixed vegetable salads in Spain. *J. Food Safety* 16:75-86.
63. Garg, Neelima, J.J. Churey and Splittstoesser, D.F. 1990. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *J. Food. Prot.* 53:701-703.
64. Gellin, B.G., Broome, C.V., Bibb, W.F., et al. 1991. The epidemiology of listeriosis in the United States-1986. *Am. J. Epidemiol.* 133:392-401.
65. Gene-Trak ® *Listeria* Assay. DNA Hybridization Test for Detection of *Listeria*. ©1992.Gene-Trak Systems Corporation.
66. Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D. and Farver, T.B. 1991. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 a 30°C. *J. Food Prot.* 54:662-668.
67. Golden, D.A., Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. 1988. Evaluation of selective direct plating media for their suitability to recover uninjured, heat-injured, and freeze-injured *Listeria monocytogenes* from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1451-1456.
68. Goulet, V., Lepoutre, A. Rocourt, J. Cortieu, A.L., Dehaumont, P. and Veit, P. 1993. Epidémie de listériose en France-Bilan final et résultats de l'enquete épidémiologique. *Bull. Epidemiol. Hebdom.* 4:13-14. (citado en la referencia 72).
69. Gray, M.L. 1960. Isolation of *Listeria monocytogenes* from oat silage. *Science.* 132:1767-1768.
70. Guyer, S. and Jemmi, T. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1523-1527.
71. Hartman, P.A., Hartman, P.S. and Lanz W.W. 1975. Violet red bile 2 agar for stressed coliforms. *Appl. Microbiol.* 29:537-539.
72. Heisick, J.E., Wagner, D.E., Nierman, M.L. and Peeler, J.T. 1989. *Listeria* spp. found on fresh market produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1925-1927.
73. Herald, P.J. and Zottola, E.A. 1987. Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* to stainless steel at various temperatures and pH values. *J. Food Prot.* 50:894.
74. Herald, P.J. and Zottola, E.A. 1988. Attachment of *L. monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *J. Food Sci.* 53:1549-1552,1562.

75. Ho, J.L., Shands, K.N., Friedland, G., Eckind, T., and Fraser, D.W. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. Arch. Intern. Med. 146:520. (citado en la referencia 124).
76. Hof, H., Nichterlein, T. and Kretschmar, M. 1994. When are *Listeria* in foods a health risk? Trends Food Sci. Technol. 5:185-190.
77. Hof, H. and Rocourt, J. 1992. Is any strain of *Listeria monocytogenes* detected in food a health risk?. Int. J. Food. Microbiol. 16:173-182.
78. Hof, H. and Hefner, P. 1988. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. Infection 16 (Suppl.2):141-144 (citado en la referencia 121).
79. Jay, J.M. 1986. Modern Food Microbiology. 3rd edition. Van Nostrand Reinhold Co., Inc, New York. pp. 97-127.
80. Jeong, D.K. and Frank, J.F. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. J. Food Prot. 57:576-586.
81. Johansson, T.M.L., Maijala, R.L., and Him, J.A. 1995. A less hazardous enrichment broth for *Listeria* without cicloheximida and acriflavine. J. Food Prot. 58:1263-1267.
82. Kammer, R.B. 1982. Moxalactam; clinical summary of efficacy and safety. Rev. Infect. Dis. 4:712-719. (citado en la referencia 28).
83. Kerr, K.G., Birkenhead, D., Seale, K. et al. 1993. Prevalence of *Listeria* spp. on the hands of workers. J. Food Prot. 56:744-749.
84. Klima, R.A. and Montville, T.J. 1995. The regulatory and industrial responses to Listeriosis in the USA: A paradigm for dealing with emerging foodborne pathogens. Trends Food Sci. Technol. 6:87-93.
85. Kvenberg, J.E. and Archer, D.L. 1987. Economic impact of colonization control on foodborne disease. Food Technol. 41 (7) : 77-81.
86. Linnan, M.J., Mascola, L., Dong Lou, X. et. al. 1988. Epidemic Listeriosis Associated with Mexican-Style Cheese N. Engl. J. Med. 319:823-828.
87. Lopes, J.A. 1986. Evaluation of dairy and food plant sanitizers against *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. J. Dairy Sci. 69:2791-2796.
88. Lovett, J. Francis, D.W. and Hunt, J.M. 1987. *Listeria monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence and pathogenicity. J. Food Prot. 50:188-192.

89. Lovett, J. 1988. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Food Tech. 42(4): 172-175.
90. Lovett, J. Twedt, R.M. 1988. Bacteria associated with foodborne diseases. *Listeria*. Food Technol. 42 (4):188-191.
91. MacDonal, T.T. and Carter, P.B. 1980. Cell-mediated immunity to intestinal infection. Infect. Immun. 28:516-523. (citado en la referencia 121).
92. Marsden, J.L. 1994. Industry perspectives on *Listeria monocytogenes* in foods: Raw-meat and poultry. Dairy Food Environ. Sanitation. 14:83-86.
93. Mohd-Som, F., Spomer, L.A., Martin, S.E. and Schmidt, S. 1995. Microflora changes in misted and nonmisted broccoli at refrigerates storage temperatures. J. Food Quality. 18:279-293.
94. Mountney, G.J. and Wilbur, A.G. 1971. Fruits and vegetables. In Practical Food Microbiology and Technology. 3rd. Edition. AVI, Published by Von Nostrand R, New York.
95. Mustapha, A. and Liewen, M.B. 1989. Destruction of *Listeria monocytogenes* by sodium hipochlorite and quaternary ammonium sanitizers. J. Food. Prot. 52:306-311.
96. Nguyen-the, C. and Lund, B.M. 1992. An investigation of the antibacterial effect of carrot on *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol. 73:23-30.
97. Nguyen-the, C. and Lund, B.M. 1991. The lethal effect of carrot on *Listeria* species. J. Appl. Bacteriol. 70:479-488.
98. Paterson, J.S. 1940, Antigenic structure of organisms of the genus *Listerella* J. Pathol. Bacteriol. 51:427-436. (citado en la referencia 121).
99. Paterson, J.S. 1939. Flagellar antigens of organisms of the genus *Listerella*. J. Pathol. Bacteriol. 48:25-32. (citado en la referencia 121).
100. Peeler, J.T., Houghtby, G.A. and Rainosek, A.P. 1992. The Most Probable Number Technique. In Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C. and Solittstoesser, D.F. (Eds.). 3rd Edition. American Public Health Association. Washington, D.C., U.S.A. pp. 105-2-120.
101. Petran, R.L., Zottola, E.A. and Gravani, R.B. 1988. Incidence of *Listeria monocytogenes* in market samples of fresh and frozen vegetables. J. Food Science. 53:1238-1240.
102. Petran, R.L., and Zottola, E.A.. 1989. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. Food Sci. 54:458-460.

103. Pinner, R.W., Schuchat, A., Swaminathan, B., Hayes, P.S., Deaver, K.A., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D., Reeves, M. Broome, C.V., Wenger, J.D. and the *Listeria* study group. 1992. Role of foods in sporadic listeriosis II. Microbiological and epidemiologic investigation. JAMA 267:2046-2050.
104. Pishawikar, M.S., Singhal, R.S. and Kulkarni, P.R. 1992. Rapid non-microbiological methods for detecting microorganisms in foods. Trends Food Sci. Technol. 3:165-168.
105. Poyart-Salmeron, C., Trieucuoat, P., Carlier, C., Macgowan, A., Maclauchlin, J. and Courvalin, P. 1992. Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. 36:463-366. (citado en la referencia 72).
106. Racz, P., Tennar, K and MÉRÖ, E. 1972. Experimental *Listeria* enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. Lab. Invest. 26:694-700. (citado en la referencia 121).
107. Rocourt, J. 1994. *Listeria monocytogenes*: the state of the science. Dairy Food Environ. Sanitation. 14:70-82.
108. Rodríguez, J.L., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M. 1993. A comparative study of the Gene-Trak *Listeria* assay, the *Listeria*-Tek ELISA test and the FDA method for the detection of *Listeria* species in raw milk. Lett. in Appl. Microbiol. 17:178-181.
109. Ryser, E.T. and Marth, E.H. 1991. *Listeria*, listeriosis, and Food Safety. Marcel Dekker, Inc.
110. Sacks, L.E. and Mihara, K. 1983. Induction at high frequency of a unique phenotypic class of *Bacillus subtilis* mutants by methylxanthines. Mutat. Res. 117:55-65. (citado en la referencia 28).
111. Saldaña Lozano, J. 1992. Costo económico de las enfermedades de naturaleza microbiana transmitidas por los alimentos. Resúmenes del V Simposium sobre nutrición. Kellogs. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
112. Sanaa, M., Poutrel, B., Menard, J.L. and Serieys, F. 1993. Risk Factors Associated with Contamination of Raw Milk by *Listeria monocytogenes* in Dairy Farms. J. Dairy Sci. 76:2891-2898.
113. Sax, N.I. and Lewis, R.J. 1988. Dangerous properties of industrial materials, 7th Ed. Van Nostrand Reinhold, New York. (citado en la referencia 28).
114. Schelch, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., et. al. 1983. Epidemic Listeriosis-evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med. 308:203-206.

115. Schlech, W.F. III. 1992. Expanding the horizons of foodborne listeriosis. JAMA. 267:2081-2082.
116. Schuchat, A., Deaver, K.A., Wenger, J.D., Plikaytis, B.D., Mascola, L., Pinner, R.W., Reingold, A.L., Broome, C.V. and the *Listeria* group. 1992. Role of foods in sporadic Listeriosis I. Case-Control study of dietary risk factors. JAMA 267:2041-2045.
117. Seeger, K. and Griffiths, M.W. 1994. Adenosin triphosphate bioluminescence for hygiene monitoring in health care institutions. J. Food Prot. 57:509-512.
118. Seeliger, H.P.R., and Jones, D. 1986. *Listeria* spp. 1235-1245. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Vol. 2, 9th Ed. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (Eds). Williams & Wilkins, Baltimore.
119. Seeliger, H.P.R. 1961. Listeriosis, Hafner Publishing Co., New York. (citado en la referencia 121).
120. Serological identification of *Listeria*. Difco Laboratories 1975. Detroit Michigan USA.
121. Sismur, K. and Walker, C. 1988. *Listeria* in prepared salads. Lancet I. 1167.
122. Slade, P.J. 1992. Monitoring *Listeria* in the food production environment. I. Detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. Food Research International 25:45-56.
123. Slade, P.J. 1992. Monitoring *Listeria* in the food production environment. II. Identification techniques. Food Research International 25:203-214.
124. Smith, C.W. and Metzger, N. 1962. Demonstration of capsular structure on *Listeria monocytogenes*. Path. Microbiol. 25:499. (citado en la referencia 54).
125. Sorrells, K.M., Speck, M.L. and Warren, J.W. 1970. Pathogenicity of *Salmonella gallinarum* injury by freezing. Appl. Microbiol. 19:39-43.
126. Splittstoesser, D.F. and Corlett, Jr. D.A. 1980. Aerobic plate counts of frozen blanched vegetables processed in the United States. J. Food Prot. 43:717-719.
127. Stedman, R.L., Kravitz, L.E. and Bell, H. 1955. Studies of the efficiencies of disinfectants for use on inanimate objects: Factors of importance in practical disinfecting procedures. Appl. Microbiol. 3:273-276.
128. Steinbruegge, E., Burt Maxcy, R. and Liewen, M. 1988. Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. J. Food Prot. 51:596-599.
129. Sveum, W.H, Moberg, L.J., Rude, R.A. and Frank, J.F. 1992. Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C. and

- Solittstoesser, D.F. (Eds.). 3rd Edition. American Public Health Association. Washington, D.C., U.S.A. pp. 51-74.
130. Swanson, K.M.J., Busta, F.F., Peterson, E.H. and Johnson, M.G. 1992. Colony Count Methods. In Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C. and Solittstoesser, D.F. (Eds.). 3rd Edition. American Public Health Association. Washington, D.C., U.S.A. pp. 75-95.
 131. Todd, E.C.D. 1978. Foodborne disease in six countries- a comparison. J. Food Prot. 41:559-565.
 132. Todd, E.C.D. 1989. Preliminary estimates of costs of foodborne diseases in the United States. J. Food Prot. 52 : 595-601.
 133. Todd, E.C.D. 1985. Economic loss from foodborne disease and nonillness related recalls because mishandling by food processors. J. Food Prot. 48:621-633.
 134. Toora, S. 1995. Inactivation of pathogenic serogroups of *Yersinia enterocolitica* by chlorine. J. Food Prot. 58:1383-1385.
 135. Van Renterghem, B., Huysman, F. Rygole, R. and Verstraete, W. 1991. Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. J. Appl. Bacteriol. 71:211-217.
 136. Varnam, A.H. and Evans, M.G. 1991. *Listeria monocytogenes* In Foodborne Pathogens. An illustrated text. Wolfe Publishing Ltd. London England pp. 327-353.
 137. Vines, A. and Swaminathan, B. 1997. Nucleotide sequence analysis of two virulence-associated genes in *L. monocytogenes* serotype 1/2b and comparison with the same genes in other serotypes important in human disease. Lett. Appl. Microbiol. 24:166-168.
 138. Walker, S.J., Archer, P. and Banks, J.G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J. Appl. Bacteriol. 68:157-162.
 139. Weis, J. and Seeliger, H.P.R. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Nature. Appl. Microbiol. 30:29-32.
 140. Welshimer, H.J. 1968. Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. J. Bacteriol. 95:300-303.
 141. Welshimer, H.J. 1960. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. J. Bacteriol. 80:316-320.
 142. Zhang, S, and Farber, J.M. 1996. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. Food Microbiol. 13:311-321.