

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA



DETECCION DE *Listeria monocytogenes* Y *Listeria spp*
EN PUNTOS CRITICOS ESTABLECIDOS EN UNA
PLANTA PROCESADORA DE PRODUCTOS
CONGELADOS PARA RAPIDO CONSUMO

T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

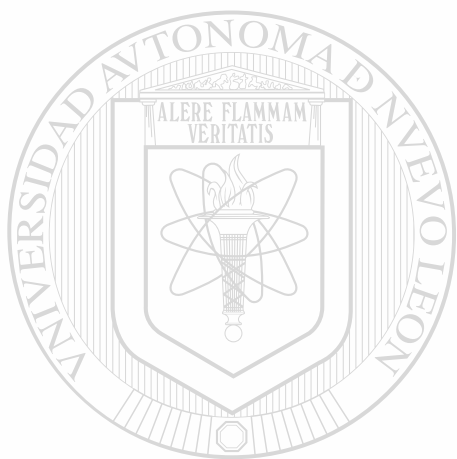
PRESENTA:

FRANCISCO JAVIER SANCHEZ VELAZQUEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., SEPTIEMBRE DEL 2003

FISV

IM
Z5320
FCB
2003
.S25



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

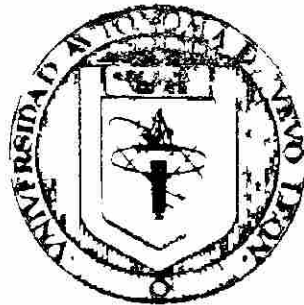


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* - *Listeria spp*
EN PUNTOS CRÍTICOS ESTABLECIDOS EN UNA
PLANTA PROCESADORA DE PRODUCTOS
CONGELADOS PARA RÁPIDO CONSUMO

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ESIS

QUE EN OPCIÓN AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA

PRESENTA

FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ VELÁZQUEZ

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L., SEPTIEMBRE DEL 2003

97 25

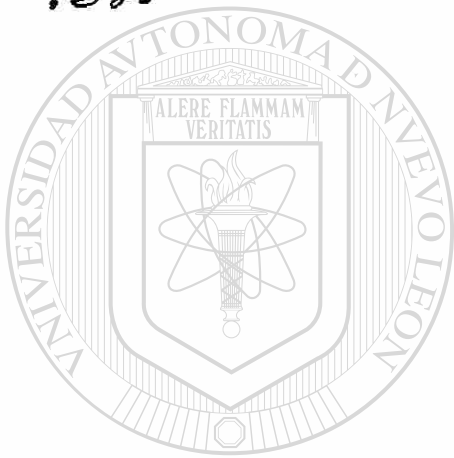
TH

Z53 0

F08

2003

.S25



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

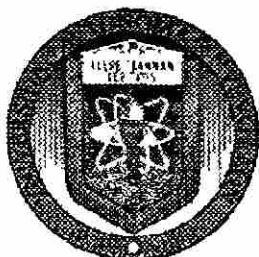


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO
TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* Y *Listeria spp* EN PUNTOS
CRÍTICOS ESTABLECIDOS EN UNA PLANTA PROCESADORA DE
PRODUCTOS CONGELADOS PARA RÁPIDO CONSUMO**

TESIS

**QUE EN OPCIÓN AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ VELÁZQUEZ

San Nicolás de Los Garza, N.L.

Septiembre del 2003

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

**DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* Y *Listeria spp.* EN PUNTOS
CRÍTICOS ESTABLECIDOS EN UNA PLANTA PROCESADORA DE
PRODUCTOS CONGELADOS PARA RÁPIDO CONSUMO**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARACIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA**

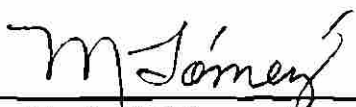
Presenta

FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ VELÁZQUEZ

COMISIÓN DE TESIS



**Dra. Licet Villarreal Treviño
Presidente**



**Dra. Marivel Gómez Treviño
Secretario**



**M.C. Arturo Espinoza Mata
Vocal**

San Nicolás de los Garza, N.L.

Septiembre del 2003

ÁREA DE TRABAJO

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Médica y Sanitaria del Departamento de Microbiología e Inmunología, perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. **Licet Villarreal Treviño** y la asesoría del **M.C. Arturo Espinoza**

Mata.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A Dios, por ser un padre amoroso, por ser el motor que mueve los engranes de mi vida, por ser el mejor consejero y amigo, por haberme concedido la vida y el privilegio de tener una familia, por darme la oportunidad de estudiar y desarrollarme en el trabajo. Gracias.

A mi madre, Antonia, por su inmenso amor y sacrificio que realizó por mí, por demostrarme que queriendo se pueden lograr muchas cosas en la vida y que a pesar de la adversidad, siempre hay un mejor mañana lleno de esperanza. Por señalarme el camino a seguir, por estar siempre a mi lado, pero sobre todo por darme la vida. Gracias. Amá. Todo lo que soy se lo debo a usted.

A mis hermanos Joselín, Ana María, Margarita, María Elena, Juan Francisco: por su invaluable apoyo y consejo, su infinita amistad, por que son mi ejemplo de superación, esfuerzo, tenacidad, lucha, sacrificios. Por la unión que tenemos, por los grandes momentos que hemos compartido y también los malos: por los triunfos y los fracasos. Gracias, los llevo en el corazón y en le pensamiento. También a mi hermano Joel, que en paz descansa.

A mis cuñados: Luis Antonio, Graciela, Benito y Verónica, por pertenecer a esta gran familia y por su apoyo.

A mis numerosos sobrinos, Ana, Raquel, Ismael, José, Graciela, Israel, Joselín, Angela, Mariela, Gaby, Joelín y mi ahijada Andrea, por llenar la casa de alegría y de mucha luz.

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
el apoyo económico brindado a través de la beca para la realización
de los estudios de Postgrado.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) por el apoyo económico otorgado a través del proyecto de investigación CN498-01.

Al Dr. Arturo Espinoza Mata, por brindarme su apoyo incondicional en lo espiritual, moral, y económicamente tanto en mi época de estudiante como en las diferentes épocas que han sucedido a través de los muchos años de enorme amistad: por darme la oportunidad de aprender y absorber su experiencia que tiene en este campo de la Microbiología y así superarme diariamente, por ser tolerante, paciente con mi persona y allanarme el camino a veces cubierto de obstáculos con sus sabios consejos como si fuera mi padre: por darme la oportunidad de conocer y compartir momentos de suma importancia en la vida de su grandiosa familia: M.C. Emma Valadez, Arturo y Alejandro. Gracias, los quiero mucho. Mucho de lo que soy se lo debo a Usted.

A la Dra. Cicet Villarreal Treviño, por brindarme la oportunidad de realizar un sueño largamente deseado, por sus consejos en la elaboración de este trabajo y por creer en mí.

Gracias.

A la Dra. Marivel Treviño, por aceptar ser parte de mi sueño, un sueño que se ha hecho realidad, por su apoyo y sus conocimientos aportados en la realización de este trabajo.

Gracias.

A la Q.B.P. María Isabel Martínez M., por su asesoría valiosa en este proyecto de investigación, por empujarme a hacer las cosas cuando yo no quería, por abrirme también las puertas de su casa y lo más importante por darme su amistad, por respaldarme siempre y en cada momento bueno o malo, por demostrarme que puedo contar con usted en cualquier momento, por animarme, comprenderme, por aportarme muchos

conocimientos sobre todo de los Coliformes y *Salmonella*, por integrarme a su familia: *Mónica y Arturo*. Gracias por creer en mí y apoyarme siempre. Los quiero mucho.

A la *M.C. Mely Vela*, por su amistad, por sus conocimientos que me ha impartido durante todo este tiempo, por su gran calidad como persona y maestra.

A la *Dra. Guadalupe Maldonado*, por su gran amistad, consejos y reflexiones, por darme su confianza, por escucharme y entenderme.

A *M.C. Mirna Aratza* y *M.C. Eduardo Sánchez*, por coincidir en un momento tan importante, por su madurez y comprensión, por que son el refugio y la fortaleza perfecta para esos momentos de alegría, de sufrimiento, de tensión y estrés al compartir el salón de clases y otros detalles de la vida. Por ser como ángeles de la guarda, por sus consejos, palabras, aliento pero sobre todo por quererme y darme tanto cariño, por esta amistad tan gratificante. Gracias, los quiero mucho.

A *M.C. Viviana Mata*, por el tiempo y gran ayuda para realizar este trabajo, ya sea en la computadora y la presentación, gracias por ser una gran amiga; a *Q.B.P. Margarita González*, por la gran amistad que ha surgido y espero que nunca acabe, por estar presente en los buenos y malos momentos; al *Q.B.P. Daniel Muñoz*, por su amistad y nobleza, por ser excelente persona, también a *Q.B.P. Iván Terrazas*; al *Q.B.P. Alejandro Valadez*, *L.C.A Karla González*, *Q.B.P. Reyna Treviño*, *Q.B.P. Edgar Juárez*, *Q.B.P. Paty Jiménez*, *Q.B.P. José Luis*, *Q.B.P. Julio Cesar* y *LIC Adriana Cimón-Guadalupe Zavala*, *Alberto y Julia Carrizales*, *M.C. Betty Gomez*, *Q.B.P. Alejandro Cozada*, *Q.B.P. Vessy Castro*, *Q.B.P. Eric de León*, *ING. Karina Guerrero*, por su amistad y apoyo. Gracias.

A todas las personas que contribuyeron de menor a mayor manera en la culminación de este proyecto. Gracias.

INDICE DE CONTENIDO

Lugar de trabajo	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice de contenido	vii
Lista de figuras	viii
Abreviaturas y símbolos	ix
Resumen	x
Introducción	1
Antecedentes	5
Hipótesis	22
Objetivo General	23
Objetivos Específicos	24
Material y Métodos	25
Aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria spp</i> en alimentos	
Aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria spp</i> en materia prima	
Aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria spp</i> de aire interno	
Aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria spp</i> en agua potable	
Aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria spp</i> en agua residual	
Aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria spp</i> en superficies inertes	
Aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria spp</i> de superficies vivas	
Resultados	34
Discusiones	40
Conclusiones	49
Literatura consultada	50

LISTA DE FIGURAS

Fig		Pág
1	Diagrama de flujo de metodología para detección de Listeria monocytogenes y otras especies en alimentos y materia prima	32
2	Diagrama de flujo de la metodología empleada para la detección de Listeria monocytogenes y otras especies en aire, superficies vivas e inertes, agua potable y residual.	33
3	Incidencia de Listeria spp. en materia prima empleada para producción	34
4	Incidencia de Listeria spp. en producto terminado	35
5	Incidencia de Listeria spp. en superficies	36
6	Incidencia de Listeria spp. en la planta productora de alimentos en 2 niveles de producción	36
7	Incidencia de Listeria spp. en superficies inertes de la planta productora de alimentos	37
8	Incidencia de Listeria spp. en agua empleada y generada en la planta productora de alimentos	37
9	Porcentaje de incidencia de Listeria spp. en muestras de ambiente interno de la planta	37
10	Distribución del total de muestras con relación a la presencia de Listeria spp. en la planta	38
11	Listeria monocytogenes en Agar Oxford y Agar LPM	39
12	Crecimiento en Agar sangre de L. monocytogenes y L. innocua	39

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

α	Alfa
AST	Agar soya tripticasa
ASTEL	Agar soya tripticasa con extracto de levadura
β	Beta
° C	Grados Celsius
CCP	Punto crítico de control
CSTEL	Caldo soya tripticasa con extracto de levadura
DNA	Acido desoxirribonucleico
FDA	Agencia de alimentos y drogas
FSIS	Servicios de inspección y seguridad de los alimentos
h	hora
HACCP	Análisis de riesgos y control de puntos críticos
LPM	Agar cloruro de litio fenil-etanol moxolactamo
ml	Mililitros
min	Minutos
NOM	Norma Oficial Mexicana
NACMCF	Comisión nacional de consultorias sobre criterios microbiológicos para alimentos
NMP	Numero más probable
NASA	Agencia nacional aeroespacial
OXA	Agar oxford
%	Por ciento
pH	Potencial hidrogeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Ampliación al azar de DNA polimórfico
seg	Segundos
UFC	Unidades formadoras de colonias
USDA	Departamento de agricultura de Estados Unidos

RESUMEN

El desarrollo de la industria alimenticia como consecuencia de la exigencia de una población deseosa de consumir alimentos que cumplan con los estándares de calidad, ha originado que se implemente tecnología de punta en las plantas productoras de alimentos originando cambios que afectan la epidemiología de las enfermedades alimenticias y como consecuencia de ello, nuevos riesgos microbiológicos como es el surgimiento de patógenos que no eran reconocidos como tales y que ahora adquieren un papel preponderante dentro la microbiología sanitaria. Tal es el caso de *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* o157:H7, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*, entre otros, esta última de hábitat cosmopolita y que por lo mismo puede que se verifique su presencia en diversos ambientes y alimentos, por lo que su detección en los puntos críticos de control que se establezcan en la planta procesadora, servirá para tomar medidas correctivas de higiene y desinfección en todo el proceso. Por ello, se colectaron adecuadamente muestras de aire, agua potable, agua residual, superficies vivas e inertes, materia prima y producto terminado, las cuales se procesaron acorde al método establecido según NOM-143-SSA1-1995 con cierta modificación en lo que se refirió a las muestras de aire y agua potable.

Esto condujo a la obtención de 0.5 % de incidencia de *Listeria monocytogenes* y 6 % de *Listeria innocua* en producto terminado, mientras que en la materia prima solo el 3% para el patógeno, *L.m*. En las superficies vivas e inertes se detectó un 3 y 36 % de incidencia para *L. i* respectivamente y la ausencia de *L. m*. En agua potable y aire no se detectó ninguna de las dos especies, mientras que en agua residual se presentó un 100 % de *L. i*. Esto indica que existe escasa incidencia del patógeno en cuestión en la planta, pero también condiciones adecuadas para que pueda establecerse en la misma, como lo demuestra la presencia de la especie saprófita detectada en varias muestras, por lo que el cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura, así como el seguimiento del HACCP implementado, serán la pauta para evitar la introducción y establecimiento de *Listeria monocytogenes* en la planta estudiada.

INTRODUCCION

Como consecuencia de la globalización, en la actualidad, la industria alimentaria se ha desarrollado a pasos agigantados gracias a que ha adquirido tecnología de punta, con la cual ha sido posible incrementar la cantidad de productos dirigidos a una población más grande y exigente con respecto a los estándares organolépticos, fisicoquímicos y microbiológicos, y de esa manera cumplir con los requerimientos de un mercado cada vez más competitivo. (Frazier, W.C., 1993).

Los cambios demográficos, así como los estilos de vida del consumidor y las diversas preferencias alimenticias, cabe mencionar el empleo de métodos rápidos de preparación de alimentos, la manufactura de alimentos prácticos o de conveniencia, así como alimentos más frescos, o minimamente procesados que cumplan con especificaciones de salud, pueden influenciar en la formulación, manufactura, nuevos procesos, preservación, nuevas técnicas de empaque y la distribución que se han incorporado en la actualidad a la fabricación de productos alimenticios. (Knabel, S.J., 1995).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las buenas prácticas de manufactura que se deben cumplir en la producción de alimentos, no son de utilidad cuando el hombre, durante la manipulación del producto llega a contaminarlos al momento de la producción, proceso, distribución y/o preparación. La mayoría de las descripciones de los brotes de enfermedades transmitidos por alimentos, señalan como causas los defectos o prácticas no correctivas en los establecimientos donde se sirven o preparan alimentos, así como en los hogares, en conjunción a una serie de acontecimientos que difieren en algo de acuerdo a cada agente etiológico que se presente. (ICMSF, 1994); por lo tanto, sabemos que las enfermedades ligadas al

consumo de los alimentos son, en efecto, consideradas como la mayor causa de morbilidad y mortalidad, tanto en los países industrializados como en los subdesarrollados. (Aureli, P., 1998).

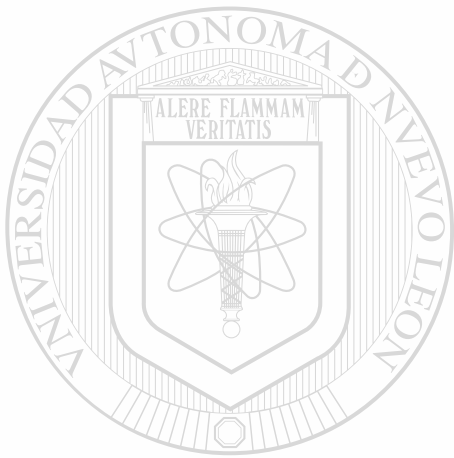
Todos estos cambios afectan la epidemiología de las enfermedades transmitidas por los alimentos, presentando nuevos riesgos microbiológicos, así, en las dos décadas pasadas, varios microorganismos que no fueron previamente reconocidos como patógenos importantes como tales, han sido descritos recientemente y han adquirido un papel preponderante en el escenario de la microbiología sanitaria, así pues, ***Campylobacter jejuni***, ***Escherichia coli O157:H7***, ***Listeria monocytogenes***, ***Vibrio vulnificus***, ***Vibrio cholerae*** y ***Yersinia enterocolitica***, son hoy en día dolores de cabeza para muchos productores y microbiólogos de alimentos, ya que algunos de ellos pueden crecer a temperaturas de refrigeración y sobrevivir a una gran diversidad de tratamientos de preservación, lo que se relaciona con la habilidad del microorganismo para adaptarse al medio ambiente. (Lovett, J. et al., 1988; Knabel, S.J., 1995).

Todas son de importancia en lo que se refiere a calidad sanitaria pero en el caso particular de ***L. monocytogenes***, últimamente ha adquirido mucho más, ya que ha ocasionado varios brotes en la Unión Americana. ***L. monocytogenes*** es una bacteria gram positiva de forma bacilar, no formadora de esporas, aeróbica, generalmente móvil, catalasa positiva, su temperatura óptima de crecimiento es de 30 – 35 °C, pero puede crecer dentro de una escala que va desde 1 °C hasta un valor cercano a los 45 °C. La ingestión de ***L. monocytogenes*** es de riesgo para el humano, ya que puede resultar en listeriosis. Esta bacteria patógena reside frecuentemente en el tracto gastrointestinal de muchos animales, se ha encontrado en por lo menos 37 especies de mamíferos (tanto domésticos como salvajes), así como por lo menos 17 especies de pájaros y algunas especies de peces y mariscos.

El microorganismo entra en la cadena alimentaria indirectamente por el esparcimiento de heces dentro del medio ambiente o directamente por contaminación durante la producción en el campo, en el procesamiento, la distribución y preparación para el consumo. (Miller, A.J. et. al., 1997). Su habilidad para crecer a menos de 5°C y a una actividad de agua baja, explica la frecuente presencia del patógeno en ambientes (piso y drenajes, especialmente en áreas alrededor de refrigeradores y lugares sujetos a contaminación externa) de plantas manufactureras de alimentos, particularmente en biofilmes formados en superficies, incluyendo acero, vidrio, plástico y otros materiales. (Miller, A.J. et. al., 1997), por lo que, la responsabilidad de quienes procesan alimentos para todas las capas de la sociedad es grande, ya que además de ofrecer productos alimenticios que cumplan una función nutrimental, éstos deben de estar exentos de contaminantes que atenten contra la salud de los consumidores. Por ello, su seguridad juega un papel primordial, tanto que existen métodos científicos para llevarla a la práctica en la industria. Así, se han introducido en varias industrias procesadoras de alimentos en la década actual, tres corrientes muy importantes frente a los aspectos de inocuidad y calidad: el control total de la calidad , el sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos (HACCP) y las buenas prácticas de manufactura, estas herramientas ya son parte del glosario de toda empresa responsable . (Tecnología de Alimentos, Industria. 1998).

Estos sistemas pueden garantizar la calidad, ya que su aplicación se realiza a diferentes eslabones de la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta el consumo, además se puede ligar al programa de aseguramiento de calidad; los cuales en conjunto darán un enfoque sistemático para identificar peligros y estimar los riesgos a fin de establecer la medida para controlarlos. (Manual de aplicación del sistema HACCP, 1993), presentando especial atención a cada uno de los trabajadores del sistema alimentario, los cuales, juegan un rol significativo al de vigilar y controlar todo el proceso, para reducir riesgos de enfermedades transmitidas por alimentos, durante la adquisición, almacenamiento, preparación, servicio y consumo. (Knabel, S.J., 1995).

En virtud de que existe poca información de la incidencia de ***L. monocytogenes*** en plantas procesadoras de alimentos, su uso como microorganismo clave para detectar puntos críticos es muy importante, ya que su hallazgo servirá para establecer medidas de control que conlleven a la obtención de alimentos microbiológicos estables e inocuos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANTECEDENTES

1.- *Listeria monocytogenes*

En los años 80, *Listeria monocytogenes* se reconoció como un patógeno transmitido por alimentos, cuando los científicos y las autoridades de salud reconocieron que la bacteria presentaba un potencial para causar serios problemas de salud, que es agravado debido a su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración. (James, 1992 , Schuchat, 1991). En el año de 1981, ocurre un primer brote por este patógeno a causa del consumo de una ensalada de col, manufacturada con vegetales cultivados en suelos abonados con estiércol de ovejas (Scharwtz y cols, 1988).

Paralelo a estos brotes, en el periodo del año 1983 a 1987, se suscitaron 6 más en ciudades como Boston, Los Angeles, Philadelphia, Arizona, y en los cuales los alimentos involucrados fueron principalmente leche y productos derivados de la misma (Silliker, 1986; FDA, 1992).

Después, una investigación llevada a cabo por el Centro de Control de Enfermedades en Atlanta, reveló que durante el periodo de diciembre de 1998 a febrero de 1999, ocurrieron 75 casos de listeriosis transmitida por alimentos entre los que se involucraron "hot dog" y productos marinos contaminados. (Dillon, et al., 1993). En Francia, en octubre del 1999 a marzo del 2000, se detectaron tres casos de listeriosis, donde se involucró como alimento de transmisión a un producto cárnico de res y a un producto cárnico de puerco.

Nuevamente, en octubre 2000 a enero del 2001, el Centro de Control de Enfermedades de Carolina del Norte, reportó tres casos de listeriosis causados

por queso fresco estilo mexicano hecho en casa producido con leche cruda contaminada que provenía de una granja local.

Un caso de contaminación de productos similares a los curados que estudiaron en Atlanta, se presentó en el mercado mexicano con salchichas provenientes de E.U.A, y exportadas a México, para almacenes de venta al mayoreo. Sé prohibió su venta de acuerdo a lineamientos de Secretaría de Salud, una vez que se comprobó la presencia del microorganismo y fue retirada del mercado justo a tiempo, lo cual se consideró como una buena estrategia por las autoridades de salud de ambos países. (El Norte, 2001).

2.- Incidencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos, agua, superficies vivas e inertes y ambiente.

Debido a que *L. monocytogenes* se encuentra ampliamente diseminada, su presencia como contaminante en alimentos frescos puede hasta cierto punto ser natural, por lo mismo muchos alimentos han sido involucrados en los brotes y epidemias de listeriosis como la leche (Fleming, D.W. et al., 1985), queso (James et al., 1985) y ensalada de col, zanahoria y cebolla (Schlech, W.F. et al., 1983). En el año de 1979 en Boston se presentó una epidemia debido al consumo de vegetales crudos especialmente apio, tomates y lechuga, mismos que fueron estudiados por Ho, J.L. et al., 1986. Y realizando investigación en este aspecto, Schlech, W.F., et al.,(1983), llevaron a cabo varios aislamientos de *L. monocytogenes* a partir de ensalada de col, zanahoria y cebolla refrigerada durante una epidemia de listeriosis en Canadá, además de obtener el mismo serotipo (4b) de muestras sanguíneas de un paciente.

Alvarez, M.B. et al., (1995), reportan que debido a que las verduras son vehículos de transmisión importante de *L. monocytogenes*, se ha intentado

proteger a los consumidores mediante la propuesta de norma de cero tolerancia en alimentos para su consumo.

Productos diferentes estudiados por, Graw, F.H. et al., (1992), en Australia, arrojaron datos de esta bacteria en 93 de 175 muestras de carnes procesadas y empacadas al vacío. En ese mismo año, Piner, R, realizó una extensa revisión de este patógeno en diversos tipos de carnes y demostró su presencia en muestras de carne aves, res, cerdo, cordero, embutidos y en productos cárnicos ya procesados. Tobia, M.B. et al., en 1997, investigaron la presencia de *Listeria spp* y *L. monocytogenes* en embutidos termoprocados, empacados al vacío, conservados en frío y consumidos sin ningún proceso de cocción o con mínimo calentamiento como salchichas tipo viena, mortadela, salchichón con jamón, provenientes de diferentes mercados; y en las cuales un 23 % de aislados fueron identificados como género *Listeria*, de las cuales 16.6 % fueron tipificadas como *L. monocytogenes*. Esta incidencia se presentó probablemente debido a una contaminación post-proceso o proceso térmico insuficiente de las muestras.

En un estudio de incidencia de *Listeria spp*. en alimentos vendidos en los Emiratos Unidos Arabes, Gohil, V.S., et al., (1994), analizaron un total de 431 muestras de productos lácteos y solo por mencionar algunos resultados, ellos encontraron que en la leche pasteurizada no hubo incidencia de *Listeria spp*. , pero en cuatro muestras de queso blanco importado se confirmó la presencia de *L. monocytogenes*; de 30 muestras de pollo fresco una contenía a la bacteria y en 18 de 39 muestras de pollo congelado también se confirmó su presencia.

Doyle, en 1997, debido a la descripción de las características ecológicas y fisiológicas de esta bacteria como un patógeno transmitido por los alimentos y su amplia distribución en los alimentos, condujo un estudio, para corroborar su frecuente ocurrencia en los mismos; además de ello, enfatizo, que este microorganismo es más persistente en los alimentos debido a que crece sobre

superficies como condensadores, paredes, techos y utensilios de limpieza en las plantas procesadoras de alimentos de donde se desprende la posibilidad de que los alimentos sean totalmente involucrados en la contaminación de dicho patógeno, a partir de dichas fuentes. Esto, reviste gran importancia por lo que muchos estudios se han enfocado a la detección de la bacteria en superficies inertes como el trabajo realizado por Lowry, P.D. et al., (1988), en Nueva Zelanda, quienes encontraron que de 30 a 65 % de las superficies de trabajo y cuchillos resultaron positivos para *L. monocytogenes*. Un año mas tarde, Sinelling, A.M. et. al., (1991), analizaron la sobrevivencia de *L. monocytogenes* en las puntas de los dedos de los manipuladores de alimentos, así como los factores que afectan la eliminación del organismo por el lavado de manos y la desinfección, ellos encontraron una sobrevivencia del patógeno mayor de 60 minutos cuando el inóculo se suspendió en solución salina y este tiempo se incrementó cuando el inóculo se suspendió en leche. Similarmente, Kerr, K.G. et al., (1993) , midieron la prevalencia de *Listeria spp.*, en las manos de 99 trabajadores encargados de la producción y venta al menudeo de alimentos; esto fue realizado usando como control un grupo de 75 oficinistas, y se encontró que de los 99 trabajadores, el 12 % portaban *Listeria spp.* y el 7 % portaban *L. monocytogenes*, mientras que el grupo control no presentó el genero bacteriano.

Otros trabajos como el realizado por, San Marco y cols, en 1997, evaluaron la presencia de *Salmonella*, *Listeria* y *Yersinia* en ambientes, superficies de trabajo, equipo y manipuladores de mataderos, encontrando 11.1 % en cuchillas, 6.25 % en tablas de picar y 5.6 % en pisos, para *Salmonella spp*; para *Yersinia enterocolitica* se encontró 16.7 % en pisos y 12.5 % en tablas de corte; *L. monocytogenes*, se detecto en un 13.3 % en estropajos de pisos y 7.1 % de recipientes para lavado de manos, además de otras especies de *Listeria* encontradas en estropajos de pisos y paredes y tablas de corte. Wong en 1998 menciona que *L. monocytogenes* sobrevive por periodos prolongados en acero inoxidable y bandas de goma, materiales comúnmente usados en equipo para procesamiento de alimentos. La sobrevivencia es afectada por la temperatura, la

humedad relativa, la superficie de adhesión y el suelo. Algunos componentes de la goma inhiben el crecimiento del microorganismo en la banda, el cual también afecta la eficacia de los sanitizantes para la inactivación en las películas microbianas. Aunado a esto, Smoot y Pierson en 1998 revelaron el efecto del estrés ambiental debido a la temperatura y el pH, sobre la habilidad de *L. monocytogenes* para adherirse a superficies de contacto de alimentos como bandas y acero inoxidable. Ellos demostraron que la bacteria se puede adherir a tales superficies a una temperatura de 10 a 45 °C y los niveles máximos de adherencia de las células a ambas superficies es a una temperatura de 30 °C; por el contrario, el pH muy ácido disminuía la habilidad de *Listeria* para adherirse a las superficies de contacto, pero ésta si se puede unir si el valor del pH está 4 y 9.

Un sitio preferido por *L. monocytogenes* para habitar, además de otras bacterias potencialmente patógenas son las aguas residuales, mismas que fueron analizadas por, Watkins, J. et al., (1981), además de las aguas de río y afluentes industriales de mataderos, mercados de ganado y plantas de empaquetamiento de aves. Todas las muestras resultaron positivas a la presencia de *L. monocytogenes*. En muchas instancias, las poblaciones de *L. monocytogenes* fueron tan altas, como aquellas obtenidas para *Salmonella* y en otras fue detectada *L. monocytogenes* aun cuando *Salmonella* no estaba presente (Beuchat y Ryu, 1997). Por otra parte, Guenich y Muller en 1984, determinaron la presencia de *L. monocytogenes* en 66 muestras de aguas residuales y de efluentes después del paso biológico en una planta pretratadora de dichos fluidos y de donde aislaron 697 cepas de *Listeria* de las cuales, el 84% fueron *L. monocytogenes*, encontrando una concentración entre $10^3 - 2.4 \times 10^5$ cel/ litro y observando una multiplicación del microorganismo del 45% durante la oxidación biológica en el tratamiento de aguas residuales.

Otro trabajo similar pero realizando la detección y enumeración de *L. monocytogenes*, fue llevado a cabo en 1986 por Al-Ghazali y Al-Azawi en

Bagdad, Irak, en donde, aislaron a este microorganismo en una planta tratadora de aguas residuales en todas las etapas del proceso, en donde además, comprobaron que los pasteles de lodo residual resultantes, así como las descargas finales no estaban exentas de *Listerias*, por lo que el utilizar estos residuos como fertilizantes o rellenos sanitarios resultaría peligroso en virtud de la diseminación del microorganismo en el ambiente. Resultados semejantes se obtuvieron en otra investigación realizada por Geuenich, et al., en 1985, quienes describieron la ocurrencia de diferentes especies de *Listeria* en agua de desecho municipal, en donde aislaron 214 cepas de las cuales el 92.5 % pertenecieron a *L. monocytogenes*, 4.2 % a *L. innocua* y 3.3 % a *L. seeligeri*.

La diseminación cosmopolita de *L. monocytogenes* en el ambiente también es de gran importancia en las plantas procesadoras de alimentos, por lo que varios estudios se han llevado a cabo en los últimos años. Un ejemplo claro, es el que publica Salvat, et al., en 1992, acerca de un brote de listeriosis ocurrido en Francia en donde, las investigaciones epidemiológicas señalan a seis plantas sospechas productoras de delicatessen como las responsables del brote por lo que, junto con una planta control, se analizaron muestras provenientes de ambiente, aire y productos de dichas plantas durante dos muestreos y encontrando que el 6 % de las muestras en áreas de producto crudo fueron positivas para *L. monocytogenes* y 33 % presentaban al microorganismo en áreas de producto final.

Así, Lawrence y cols, en 1994, midieron la incidencia de *Listeria spp* y *L. monocytogenes* en ambientes de proceso de aves y productos avícolas mediante PCR múltiple, donde se encontró que el 46 % y 29 % presentaron *Listeria spp* y 26 % y 15 % para *L. monocytogenes* en el ambiente de proceso de aves crudas y cocidas respectivamente, en los productos crudos se presentó el género en un 91 % mientras que en los cocidos, en un 59 % y 0 % de las muestras, respectivamente resultaron positivas para *L. monocytogenes*. MacGowan y cols, en 1994, detectaron una incidencia de 19.7 % en los

alimentos, 93.9 % en desechos , 14.7 % de suelos y 1 % de heces para **Listeria spp**, mientras que para **L. monocytogenes**, un 10.5 %, 60 % , 0.7 % y 0.6 % en ese mismo orden. Ellos dicen que los cambios estacionales no tienen relación significativa con los porcentajes de presencia del microorganismo, además de encontrar que las aves están mayormente ligadas a **L. monocytogenes**, no así la carne, cordero, puerco y salchicha, queso, paté.

Un año después (1995), Lawrence y cols, aislaron 29 cepas de **L. monocytogenes** del medio ambiente del área de procesamiento de aves y productos de aves, estos fueron caracterizados por RAPD para medir la persistencia de ciertos genotipos dentro de este ambiente. Ellos encontraron 18 perfiles (A hasta R) en donde el 64 % de las cepas aisladas correspondían al perfil A por lo cual concluyó que fue el que más prevaleció en el medio ambiente de muestreo. Pritchard, T.J. et al., en el mismo año, compararon la incidencia de la contaminación por **Listeria** del equipo, con la del medio ambiente de procesamiento de 21 plantas de lácteos. El de 3 diferentes medios de enriquecimiento los llevó a encontrar un nivel de contaminación más alto en el medio ambiente (49.7 %) con respecto a las muestras de equipo (7.0 %), por lo que concluyen que la contaminación ambiental con **Listerias** no necesariamente se traduce en contaminación del equipo dentro de la misma planta sin embargo no se debe dejar de hacer énfasis en la limpieza y sanitización del medio ambiente de la misma.

Fenlon y cols en 1996, reportaron números bajos de **L. monocytogenes** en una amplia variedad de muestras ambientales asociadas con la producción inicial de un alimento, en este estudio se incluyen vegetación, heces y carnes para determinar la incidencia y el nivel de contaminación por **L. monocytogenes** en fuentes naturales. Al mismo tiempo, Beumer et al., 1996, usando un método de aislamiento directo, detectaron especies de **Listeria** de ambientes domésticos y utensilios de trabajo. A saber, ellos encontraron un 37% de la bacteria en estropajos y 27.2% en superficies de alrededor del desagüe del baño. Altas

cuentas fueron encontradas en estropajos y cepillos para lavado mientras que en utensilios de cocina, compartimentos para vegetales en el refrigerador y cepillos de dientes no hubo mucha frecuencia. *L. innocua* y *L. monocytogenes* fueron las especies predominantes en las muestras correspondiendo su incidencia a un 53% y 41% respectivamente, a diferencia de otras especies que resultaron con un 6% solamente.

Lida y cols, en 1998, determinaron la presencia de *L. monocytogenes* en humanos, animales y alimentos, reportando que los pacientes con listeriosis presentan el 100 % de *L. monocytogenes* en relación a los humanos saludables (1.3 %), mientras que la carne cortada y carne de cerdo presentan niveles altos de la misma que la observada en ganado vacuno y salchichas de vaca y cerdo, los serotipos mayormente aislados fueron ½ a, ½ b y 4. Cotton y cols, en 1992, al buscar la presencia de *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Salmonella* en ambientes de plantas lácteos, reportan que *Salmonella* no fue detectada en ninguna de las muestras, en cambio *Y. enterocolitica* y *L. monocytogenes* fueron aisladas en 6.8 % y 6.5 % respectivamente y otras especies de *Listeria* en 9.3 %. Los resultados demuestran a su vez, que la presencia de *Y. enterocolitica* esta en relación con valores altos en la cuenta de mesofílicos, mas no así la presencia de *L. monocytogenes*.

Kaneko y cols, en 1999, evaluaron la contaminación bacteriana en el ambiente de industrias alimenticias procesadoras de vegetales frescos listos para su consumo. Se analizó el equipo para cepillado, lavado, rebanadora y otros utensilios, donde observaron que la operación de sanitización en superficies antes y después, presentó bajos valores en la cuenta en placa; el grupo coliforme se encontró en tres muestras de ambientes, principalmente *E. coli* ; todas fueron negativas para las especies de *Listeria*. White , et al., en el año del 2001, cuantificaron mesofílicos totales, psicrófilos aerobios, Campylobacterias termofílicas, *Escherichia coli* , *Enterobacteraceas* y la prevalencia de *Salmonella spp* en 15 pies cúbicos de aire en tres plantas procesadoras de aves, donde

observaron reducciones significativas de la cuenta total aeróbica entre las áreas de desplume y desvisceración de las tres plantas, mientras que la cuenta en placa de mesofílicos fue mas alta en el área de desplume comparada con la cuenta de psicrófilos. La familia *Enterobacteracea* fue mas alta en el área de desplume de las tres plantas, igualmente, se encontraron los mismos resultados para *Escherichia coli*, *Campylobacter* termofílicas fue mas frecuente aislada de muestras del área de desplume seguida por el área de desvisceración, principalmente en la planta A. *Salmonella spp.* , no fue recuperada en ninguna de las muestras durante el curso de la investigación. En el aire frío de la línea, con la excepción de bajos niveles de Enterobacterias, *E. coli*, y *Campylobacter spp*, no se recuperaron en muestras después del área de desvisceración.

3.- Incidencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos congelados de rápido consumo.

Durante la década de los años 80s, *L. monocytogenes* emergió como un problema en carnes delicadas respecto a su vida de anaquel y otros productos procesados. La USDA y la FDA trabajaron con las plantas para proveer sus procedimientos y establecieron el límite de cero tolerancia para este patógeno en productos listos para comer. Posteriormente, en el año de 1989, la FSIS (Servicios de Inspección y Seguridad de Alimentos), propuso también cero tolerancia de *L. monocytogenes* en productos similares como hot dog y lonches de carne, a la vez que condujo un programa de monitoreo en plantas para buscar la presencia de este patógeno. Por tal razón, Hudson, J.A. et al., (1992), cuantificaron en un 39.4 % de sus muestras estudiadas, la presencia de *Listeria spp*, un 3.4% de *Yersinia enterocolitica* y un 23.2% *Aeromonas spp* móviles en alimentos cárnicos listos para comer.

Alimentos del mismo tipo se estudiaron por, Wilson, I.G., para examinar la ocurrencia de especies de *Listeria*. El encontró un 5% de muestras positivas de 8,000 analizadas; un 11 % en pollo y un 14 % en pescado, de las cuales detectó a *L. monocytogenes* en 49 % y *L. innocua* en 36 %. Cuatro años después, el mismo, Wilson, al evaluar la incidencia de especies de *Listeria* en emparedados preempacados para venta, utilizando la técnica de cuenta en placa y enriquecimiento en caldo, encontró que la frecuencia de la bacteria era mayor cuando analizaba el producto completo, que cuando se analizaban los ingredientes en forma individual .

Kaneko y cols, en 1999, evaluaron la calidad microbiana de alimentos preparados y productos frescos en tiendas de venta e industrias alimenticias, demostrando que los coliformes y la cuenta en placa de los vegetales cortados para ensalada están mas contaminadas que todos los alimentos investigados. Aunque *L. monocytogenes* no fue detectado, los vegetales y algunos alimentos cocidos presentan otras especies del género *Listeria*.

Francina y cols, en 1999, evaluaron la calidad microbiología y la inocuidad de alimentos listos para consumo en Johannesburg, Sud África, donde se determinó la presencia de patógenos causantes de enfermedades alimenticias y enfocarse además de la presencia de *E. coli* (no patógena). El estudio arrojó valores bajos de mesofílicos, esporas y enterobacterias, pero además detectaron *Bacillus cereus* (22 %), *Clostridium perfringes* (16 %), *Salmonella spp* (2 %) y *E. coli* no 015:H7 (2%), *Campylobacter spp*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica* estuvieron ausentes en los alimentos analizados. Guerra y cols, en los meses de octubre 1998 a abril del 2000, investigaron la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos de rápido consumo en almacenes de queso portugués maduro y semimaduro, ensalada de vegetales, carnes curadas y cocidas; así como alimentos no cocidos a base de vegetales crudos, pollo y leche; *Listeria spp* fue recuperada en un 15 %; *L.*

monocytogenes en 39 %, *L. innocua* (3 %), *L. seeligeri* (5 %), *L. ivanovii* (2 %) y *L. grayi*, en 0.5 %.

Soriano, J.M. y cols. 2001, realizaron un estudio para evaluar las especies de *Listeria* en alimentos crudos y de rápido consumo en restaurantes en España, detectando *L. monocytogenes* en 2.9% de 103 muestras estudiadas, además de encontrar a *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*.

Levine y cols, en el 2001, condujeron un programa de prueba microbiológico en productos cárnicos y avícolas de rápido consumo, buscando principalmente la prevalencia de *Salmonella*; *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 y enterotoxinas de *Staphylococcus* y detectando a la primera en carne, productos avícolas no curados y cocidos, salchichas cocidas, carne cocida y otros al igual que *L. monocytogenes*, mientras que *E. coli* O157: H7 y enterotoxinas de *Staphylococcus* no se encontraron en ninguna muestra.

Pingulkar et al., en ese mismo año, examinaron la calidad microbiológica de vegetales frescos de mercados locales y ensaladas verdes listas para comer de tres restaurantes en Mumbai, India. El lavado completo de 26 muestras de vegetales, 12 raíces, 62 tomates, 4 zanahorias, chiles y calabazitas, mostraron cuentas de bacterias totales, hongos y levaduras en un rango de 10 (6) y 10(7) cfu/g y 10(2)-10(5) cfu/g respectivamente. En ensaladas listas para comer, arrojaron rangos mas altos para las cuentas de bacterias totales 10 (6) – 10 (8) cfu/ g, y para los hongos y levaduras, 10 (4) –10(7) cfu/g. El NMP de coliformes arrojó rangos entre 3 y mayor de 1,100 en vegetales, mientras que en ensaladas listas para comer fue de 11 a 460 NMP/g, demostrando que los vegetales verdes exhiben las cuentas mas altas de coliformes totales y también la mas alta ocurrencia de coliformes fecales. La incidencia de *Listeria spp* y *Yersinia spp* se detectó en el 100 % de muestras de vegetales de mercados locales, mientras que las ensaladas listas para comer mostraron 20 y 73 % respectivamente y especies no patógenas, principalmente *Yersinia intermedia* y *L. innocua* predominaron en

la mayoría de las muestras. Sin embargo, la presencia de *L. monocytogenes* fue observada en 7 muestras de 62 tomates, 5 de 10 hojas, 2 de 4 muestras de espinacas y 1 de 4 zanahorias; por lo que, investigaron la habilidad de este patógeno para crecer en tomates en presencia de bacterias naturales, sugiriendo que las células artificialmente inoculadas 10 (3) cfu/ml, mueren después de 3 días, 12 y 14 días de incubación a 37 °C, 8-10 °C y 2-4 °C, respectivamente.

4.-*Listeria monocytogenes* y el sistema HACCP.

A partir de la introducción del Sistema HACCP como factor trascendental para el aseguramiento de la calidad en la planta de alimentos, este ha sido ampliamente estudiado e implementado para evitar la contaminación por microorganismos de cualquier otra índole.

El sistema HACCP para la inocuidad de los alimentos se abrió camino, al ser desarrollado de manera conjunta entre la Administración para la Aeronáutica y el Espacio (NASA), Laboratorios del Ejército de los Estados Unidos y la compañía para alimentos Pillsbury, quienes hacia finales de los años 60's y comienzos de los 70's, iniciaron su aplicación en la producción de alimentos con requerimientos de "cero defectos" destinados a los programas espaciales de la NASA, y luego lo presentaron oficialmente en 1971 a deliberación durante la I Conferencia Nacional de Protección de Alimentos en Estados Unidos. El sistema HACCP parece haberse inspirado en las teorías sugeridas por el Dr. W. Edwards Deming y otros, las cuales comenzaron a transformar la calidad en las líneas de producción, especialmente de vehículos de motor, en la década de los 50's en Japón, y dieron paso al desarrollo de sistemas de gestión total de la calidad (TQM), que apuntaban a mejorar la calidad de las manufacturas al tiempo que reducían los costos de producción. Luego de su debut, el sistema HACCP incrementó su aceptación en ese país en 1973 y 1974 como resultado del riesgo de botulismo en

alimentos enlatados, convirtiendo en rutinario su uso en alimentos enlatados de acidez baja.

En el año de 1989, la Comisión Nacional de Consultoría sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos (NACMCF), añadió 4 principios al protocolo original, entre ellos el establecimiento de acciones correctivas y el de verificación de procedimientos para unirlos a las ya existentes mismos que incluían : 1) análisis de peligros y evaluación de riesgos; 2) determinación de control de puntos críticos (CCP's) y 3) monitoreo de CCP's.

En el año de 1990, Adams, C.E., recopila en un estudio los esfuerzos de los Servicios de Inspección y Seguridad de Alimentos de la USDA, de incorporar el sistema de HACCP dentro de su programa de Inspección, para asegurar la efectividad del proceso desde la matanza y durante el proceso; en ese mismo año, Garrett III, E.S. et al., realizan un estudio en los Servicios Pesqueros de la Marina Nacional, para incorporar el Sistema HACCP en la industria pesquera en virtud de que el producto que manejaban al emplearlo , como alimento, puede servir como vehículo de transmisión de enfermedades.

Beard III, T.D. en 1991, apunta la necesidad de informar a los consumidores acerca de las prácticas de manipulación de alimentos, para eliminar los problemas y recurre al programa HACCP, utilizándolo como una herramienta para plantear la solución, haciendo sugerencias y medidas correctivas en el proceso, para la efectividad del mismo. En ese mismo año, Kalish, F. estudió la aplicación de los conceptos del sistema HACCP en una planta productora de jugos refrigerados para reducir las quejas de los consumidores acerca de la calidad, logrando un 40 % de reducción en casi 2 años.

En el año de 1992, Dunait, G.E. et al., discutieron la utilidad del sistema HACCP en una industria procesadora de alimentos, ya que tenían un serio problema sobre la distribución de residuos de pesticidas en los mismos, y

observaron que niveles muy bajos representaban riesgos de salud para el consumo humano. Igualmente, Van den Elzen y Snijder en 1993 en donde revisan los puntos críticos concernientes a *L. monocytogenes* durante la matanza, cortado y procesado de bovino o porcino obteniendo una incidencia del 2 a 7% en las canales y de 0 a 10% en las muestras ambientales de la parte "limpia" del área de matanza; pero en las muestras obtenidas después del enfriado y cortado se encontró un incremento en la incidencia obteniendo de 11-36 % de incidencia en los cortes primarios del cuarto de cortado y de 71-100% de las muestras ambientales obtenidas del mismo sitio.

Otro trabajo realizado por Karr, K.J. et al., (1994), en conjunto con el Servicio de Inspección y Seguridad de Alimentos del Departamento de Agricultura de USA, propusieron la factibilidad de incorporar el sistema HACCP en plantas procesadoras de carne y aves de corral, al observar los riesgos que conllevaban estos lugares y comprobar que las técnicas de inspección tradicionales eran muy cuestionables. Posteriormente, el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Reino Unido, en 1995, determinó la frecuencia de *L. monocytogenes* en queso, y encontró una mayor cantidad en queso maduro, por lo que propusieron utilizar el sistema HACCP como herramienta para minimizar la contaminación a través de toda la cadena del proceso del alimento.

Otra iniciativa la realizaron Miller, M.F. et al., (1997), para utilizar el sistema HACCP en la industria procesadora de cerdo, en la cual se había detectado una frecuencia elevada de patógenos y mismas que fueron eliminados a 0 % de incidencia cuando el programa se implementó. Los patógenos así eliminados correspondieron a *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium perfringes* y *Yersinia enterocolitica*. En un trabajo realizado sobre los riesgos y puntos críticos de control en alimentos preparados en casas comunes, Schmitt, R. et al., (1997), encontraron *Salmonella*, coliformes, termotolerantes y *Escherichia coli* aislados de muestras de restos de alimentos, de agua de pozo y del suministro comunitario, y se observó, que hubo un descuido

de temperaturas de los alimentos después de cocerlos y además de detectar manipuladores enfermos del tracto intestinal. En ese mismo año, Jermini, M. et al., evaluaron los riesgos y puntos críticos de las operaciones de venta de alimentos en una ciudad, la búsqueda de patógenos comunes transmitidos por alimentos en muestras sólidas, crudas, procesadas y cocidas en la calle o en tiendas pequeñas; llevó a la determinación de *Salmonella spp* y *S. aureus* en alimentos crudos, y *Bacillus cereus* en alimentos procesados, también se encontraron grandes poblaciones de mesofílicos aerobios, coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* recuperados de alimentos que se almacenaron durante toda la noche, y *Clostridium perfringes* en un guisado de carne.

Mientras que Ojeniyi, et al., (2000), investigan y comparan aislados de *L. monocytogenes* que proceden de casos de listeriosis y de los puntos críticos de control de una planta procesadora de pavos y sus productos en Dinamarca, donde encuentran la prevalencia de este microorganismo en un 25 a 41.4 %, además de ratificar que la limpieza y desinfección disminuyó la incidencia hasta un 6.4 %. Indican, que el tipo de DNA fue idéntico entre los que se obtienen de los productos de pavo, las líneas de proceso y los que se encuentran en los productos de pavos involucrados en los casos de listeriosis en humanos. La incidencia de *L. monocytogenes* fue de 7.3 y 17.4 % para los productos de pavo listos para comer y productos crudos, respectivamente; Observan, que aunque, no se encuentran muestras positivas en 27 bloques examinados antes de la matanza y la prevalencia se incrementa durante el procesamiento de las canales, el potencial de contaminación de la carne es debido a factores de higiene mas que a la contaminación intrínseca de los pavos. Posteriormente, Brashears, et al., (2001), implementan y validan el sistema HACCP en pequeñas plantas procesadoras de aves y carne, en Nebraska, en base a los datos microbiológicos colectados antes y después para medir la efectividad del mismo, demostrando que la cuenta de bacterias aeróbicas totales disminuyo después de la implementación del HACCP, mas no así, la cuenta de coliformes y *Escherichia coli*; sugieren cambios en los límites críticos de los puntos críticos de control y proponen a inspectores de USDA

cambios en el plan de HACCP, debido a que los datos microbiológicos colectados indican y soportan cambios en la presión de lavado de canales de ave, posteriormente en el plan fue aceptado y capacitaron a los productores a procesar bajo las nuevas condiciones.

Aunado, a las investigaciones realizadas para la implementación del sistema HACCP en las plantas procesadoras, para producir alimentos exentos de microorganismos, se han realizado estudios para desarrollar modelos de aseguramiento de riesgos, para proveer medidas que prevengan la contaminación del alimento y reducir las posibilidades de que un alimento se convierta en un vehículo de transmisión de enfermedades. Un ejemplo, es el estudio realizado por, Lammerding, A.M. et al., en 1997, donde aseguran que los modelos de análisis de riesgo facilitan la evaluación de los cambios activos o pasivos en algunos alimentos cuando son producidos, procesados, distribuidos y consumidos, además de que ofrece una herramienta para predecir el impacto de los mismos y tienden a prever alimentos seguros. Por otro lado, Buchanan, R.L. et al., en el mismo año, desarrollaron un modelo de aseguramiento de riesgos para patógenos transmitidos por los alimentos y encontraron que hay una relación entre la disponibilidad de los datos epidemiológicos para la exposición de los consumidores a los agentes biológicos y la dosis-respuesta, que revelaban los niveles de agentes biológicos con la frecuencia de infección o la enfermedad. Así mismo, Miller, A.J. et al., (1997), al utilizar el análisis cuantitativo de riesgos sobre la incidencia de *L. monocytogenes* para proveer estimaciones de cuántas acciones correctivas pueden disminuir los riesgos de listeriosis, encontraron que este sistema puede proveer de especificaciones sobre los materiales crudos, la manipulación de alimentos, las prácticas de procesamiento y regímenes de sanitización de plantas, todo con el fin de obtener productos libres de contaminación tanto saprófita como patógena.

Hitchins, et al., en el año 2001, realizan un modelo de aseguramiento de riesgos para *L. monocytogenes* transmitido por alimentos en base a la

evaluación de la presencia y niveles cuantitativos de este microorganismo en 21 grupos de alimentos listos para comer, indicando el potencial de crecimiento del mismo entre los puntos de venta donde se origina la contaminación y la frecuencia y cantidad del consumo de estos alimentos, realizando estudios en animales, ensayos de virulencia e investigaciones epidemiológicas para estimar la asociación entre la enfermedad de diferentes grupos humanos y el consumo de *L. monocytogenes*, sugiriendo que el aseguramiento del riesgo no intenta definir el nivel aceptable o tolerable del consumo del patógeno o proponer cambios en las regulaciones.

A pesar de ser un sistema que brinda una herramienta de gran importancia para la industria alimentaria, pocas plantas en México lo han implementado dentro de su proceso de producción siendo una de la que se selecciono para este estudio y en la que la necesidad de determinar a *Listeria monocytogenes* fue una de sus principales preocupaciones sobre todo porque su detección no había sido implementado como análisis de rutina tanto en la planta en sí y este microorganismo representa un riesgo para la salud de los consumidores; los resultados obtenidos formarían un precedente en este campo tan importante, como lo es la producción a gran escala de alimentos seguros e inocuos para el hombre, así como para hacer conciencia de la necesidad de desarrollar nuevas investigaciones respecto a la utilización del sistema HACCP en la industria.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

HIPÓTESIS

La naturaleza cosmopolita de *L. monocytogenes* y otras especies permitirá su detección en los puntos críticos de control establecidos en la planta procesadora de alimentos congelados para rápido consumo.



UANL

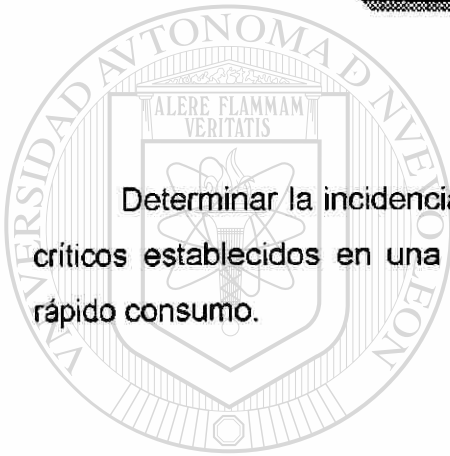
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la incidencia de *L. monocytogenes* y otras especies en puntos críticos establecidos en una planta procesadora de alimentos congelados para rápido consumo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Determinar la incidencia de *L. monocytogenes* y otras especies en materias primas para hamburguesa de carne de res y de pollo, emparedados de ensalada de pollo y de jamón con queso, taquitos de carne, enchiladas y quesadillas.

2.- Verificar la inocuidad en el producto terminado mediante la ausencia del patógeno.

3.- Determinar la incidencia de este microorganismo en superficies vivas e inertes, equipo, agua y medio ambiente.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp* EN ALIMENTOS .

A) Mantenimiento de la cepa

Se utilizó una cepa de referencia proporcionada por el Dr. James L. Smith del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norte América correspondiente a *L. monocytogenes* Scott A, la cual se mantuvo en el medio Agar soya tripticaseína (AST) (DIFCO) a 4 °C.

B) Obtención de la muestra

Estas fueron proporcionadas por la planta productora de alimentos congelados y consistieron de enchiladas, quesadillas, taquitos de carne, hamburguesas de carne y hamburguesas de pollo, emparedados de jamón y queso y emparedados de ensalada de pollo; en cuanto a la materia prima; las muestra colectadas fueron : vegetales, productos lácteos y productos cárnicos, las cuales fueron transportados bajo refrigeración hasta el laboratorio. Se colocaron a temperaturas de refrigeración de 4 a 8 °C durante 18 h para descongelación antes de realizar su análisis.

C) Aislamiento de *Listeria monocytogenes*

El aislamiento de *L. monocytogenes* se llevó a cabo en base a la metodología establecida para determinaciones de *L. monocytogenes* en alimentos y que corresponden a NOM-143-SSA1-1995 pero con la variante de llevar a cabo un segundo enriquecimiento selectivo como se menciona más adelante.

D) Preenriquecimiento No Selectivo

Antes de iniciar el análisis, el empaque de todos y cada uno de los alimentos se desinfectó con alcohol al 70 % sobre todo en la zona de apertura del mismo. Bajo precauciones de asepsia y frente al mechero se abrió el empaque con utensilios estériles y se empezó a colectar a los 25 g de muestra requeridos, tomando diversas porciones de puntos distantes de cada producto. Esta cantidad de muestra se colocó en un frasco de licuadora y se le adicionaron 225 ml de Caldo soya tripticasa – extracto de levadura (CSTEL) (DIFCO) complementado con 1.4 ml de piruvato de sodio al 10 %; la muestra y el caldo se homogeneizaron por espacio de 1-2 minutos. La suspensión obtenida se colocó nuevamente en el matraz erlenmeyer para posteriormente incubarla a 35 – 37 °C por espacio de 48 h.

E) Enriquecimiento selectivo primario

Al cabo de este período se agitó el cultivo y se tomó 1 ml para inocularlo en 10 ml de caldo de enriquecimiento para *Listeria* (DIFCO) este se incubó a 35 °C por 48 h.

F) Enriquecimiento selectivo secundario

Después se tomó 1 ml para inocularlo en 10 ml de caldo Fraser (DIFCO), al cual se le fue adicionado 0.1 ml de suplemento Fraser y se incubó a 35 °C por 24 h.

G) Aislamiento selectivo

Los tubos de caldo Fraser que presentaron ennegrecimiento del medio se consideraron como presuntivos para el microorganismo por lo que se tomó una alícuota después de haber agitado el tubo y se depositó en la superficie de placas con medio de cultivo OXA (DIFCO) y LMP (DIFCO) previamente preparados con sus complementos OXFORD (DIFCO) y MOXOLACTAM (DIFCO), respectivamente; el inóculo se dispersó mediante una siembra en cuatro cuadrantes para asegurar la distribución de las

colonias que desarrollen. Tomando la precaución de que la superficie del agar estuviera seca para un mejor aislamiento de las colonias. Los tubos de caldo Fraser que no presentaron ennegrecimiento fueron considerados negativos para presuntivas *Listerias spp.* Las placas se incubaron a 35 °C 24 h.

H) Identificación

Una vez transcurrido este lapso de tiempo, se seleccionaron las colonias típicas del microorganismo de interés que en Medio Oxford son de diámetro de 1-2 mm, negras y rodeadas de un halo negro, algunas colonias pueden aparecer con un tono café oscuro; mientras que en LPM son también pequeñas de color blanco a azul iridiscente al observar el crecimiento de las placas con luz blanca en un ángulo de 45 ° (iluminación de Henry) a simple vista. Para llevar a cabo la identificación, de las colonias que presentaron estas características se seleccionaron 5 o más de ellas del medio OXA o LMP y se traspasó a placas de ASTEL ya que las colonias aparentemente aisladas pueden estar contaminadas con flora competitiva parcialmente inhibida. Este medio se incubó por un lapso de 24 h a 35 °C.

Las colonias de este medio de cultivo se aislaron en 2 ml de CSTEEL posteriormente se incubó a 35 °C durante 24 h.

1) Tinción de Gram

Primeramente, se debe realizar una tinción de Gram a los cultivos de 24 y 48 h para confirmar que los microorganismos que se están aislando sean bacilos cortos grampositivos, ya que las especies de *Listeria* presentan estas características.

Para la tinción de Gram; sobre un portaobjetos se realizó un frotis de una colonia sospechosa, posteriormente se fijó al calor y se procedió a teñir con cristal violeta durante 1 min; inmediatamente se lavó y se tiñó con solución de yodo de Gram por 1 min, se lavó, y se le agregó alcohol-acetona para

desteñir, se lavó y e inmediatamente después se tiñó con solución de safranina durante 30 seg.

2) Pruebas bioquímicas

Transcurrido este tiempo, y a partir de este cultivo, se llevó a cabo la inoculación de pruebas bioquímicas para su identificación. A excepción de la movilidad, todas las pruebas bioquímicas se incubaron a 35 °C/48 h.

2.1) Prueba de la catalasa

Se emulsificó un cultivo puro de la colonia sospechosa con una gota de solución de peróxido de peróxido al 3 % colocada sobre un portaobjetos. La prueba se consideró positiva al detectarse la formación inmediata de burbujas.

2.2) Prueba de reducción de nitratos.

Se inocularon los tubos conteniendo caldo nitrado e incubados a 35 °C por 5 días. Para la lectura de esta prueba, se agregó 3 gotas de ácido sulfanílico y 2 gotas de solución de dimetil- α -naftilamina, un color rojo indica una prueba positiva (presencia de nitritos). Si esta coloración no se observa, se adiciona zinc en polvo, y el desarrollo de color rojo confirma una prueba negativa. *L. monocytogenes* da positiva para esta prueba.

2.3) Prueba de utilización de carbohidratos.

Se observa la producción de ácido a partir de manitol, xilosa y ramnosa al usar púrpura de bromocresol como indicador en el medio de cultivo. Los tubos inoculados se incubaron por 24 h a 35 °C. Una coloración amarilla indica una prueba positiva. *L. monocytogenes* es positiva solo para ramnosa.

2.4) Prueba de movilidad en medio de cultivo SIM.

Los tubos inoculados se incubaron a 20-25 °C por 24h. La positividad de esta prueba se observa por un crecimiento típico en forma de pino invertido. Todas las especies del género *Listeria* son positivas para esta prueba.

2.5) Prueba de hemólisis.

Sobre una caja de agar sangre se estrió en cuatro cuadrantes un cultivo puro de nuestras colonias sospechosas. Se incubó a 35 °C/24 h. La positividad de la producción de β-hemólisis en agar sangre de carnero se caracteriza por la producción de zonas claras en el agar alrededor de la colonia. Esta prueba es positiva para *L. monocytogenes*.

I) Confirmación con API Listeria (bioMérieux Marcy l'Etoile France).

A partir de un cultivo puro de la cepa problema se hizo una suspensión individual para ajustarla al tubo número 1 de la escala de McFarland mismo que se diluyó 1:1 para obtener una suspensión al 0.5 a partir de las cuales se inocularon las galerías del sistema API empleando la primera para la galería marcada como DIM y la segunda para las galerías restantes. Se incubó en atmósfera húmeda de 37 °C durante 24 h bajo condiciones aeróbicas y finalmente obtener un perfil numérico de las reacciones obtenidas y compararlo con las listas de perfiles incluidos en la ficha técnica.

2.- AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp* EN MATERIA PRIMA.

Estas fueron proporcionadas por la planta productora de alimentos congelados y consistieron de productos de origen vegetal, de origen animal de y derivados lácteos, las cuales fueron transportados bajo refrigeración hasta el laboratorio. Se colocaron a temperaturas de refrigeración de 4 a 8 °C durante 18 h para descongelación antes de realizar su análisis.

El aislamiento de *L. monocytogenes* se llevó a cabo en base a la metodología establecida para determinar la misma en alimentos y que corresponden a NOM-143-SSA1-1995 pero con la variante de llevar a cabo un segundo enriquecimiento selectivo como se menciona más adelante.

3.- AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp* DE AIRE INTERNO.

Mediante un sistema de vacío, se bombeó aire durante 30 minutos hacia un matraz con 100 ml de caldo soya tripticasa con 6% extracto de levadura (CSTEL) adicionado con 1% de piruvato de sodio, transcurrido este tiempo, se colocó la torunda al matraz. Se transportó la muestra a temperatura de refrigeración. Ya en el laboratorio se mantuvo el matraz a una temperatura de 35 °C por un lapso de 24 h.

4.- AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp* EN AGUA POTABLE.

El muestreo del agua potable se realizó de acuerdo a los procedimientos mencionados en la Norma Oficial Mexicana, NOM 014-SSA1-1993, (Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimientos públicos y privados). Tomando en consideración remover accesorios o aditamentos externos y limpiar el orificio de salida con una torunda de algodón impregnado con hipoclorito de sodio en una concentración de 100 mg/l. Debe dejarse correr el agua por 3 minutos o hasta asegurarse que el agua contenida en las tuberías ha sido vaciada totalmente. Se utilizaron bolsas para muestreo Whirl Pak^{MR} para coleccionar 100 ml de agua potable. Se transportó al laboratorio en condiciones de refrigeración y la muestra colectada de agua fue inoculada en 150 ml de CSTEL adicionado con 1% de piruvato de sodio y se mantuvo a una temperatura de 35 °C por 24 h.

5.- AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp* EN AGUA RESIDUAL.

Se instalaron hisopos de Moore estériles en los diferentes canaletas de drenajes de la planta, se dejaron por un lapso de 12 h, transcurrido ese tiempo, se extrajeron y se colocaron en bolsas Whirl Pak, se transportaron al laboratorio es condiciones similares que las demás muestras; luego, se agregó a la bolsa 100 ml de CSTEEL igualmente suplementado con 1 % de piruvato de sodio, se cierra nuevamente la bolsa y se exprime varias veces el hisopo de forma manual. Las bolsas son depositadas en una bandeja de plástico y se incuban a 35 °C por 24 h.

6.- AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp* EN SUPERFICIES INERTES.

Para la colecta de muestras de superficie, como canaletas, pisos y equipo; se utilizó el dispositivo Whirl Pak "Speci Sponge"^{MR}, consistente en una esponja estéril la cual se humedeció en un 6 ml de solución salina al 0.85% y se pasó a través de la superficie seleccionada. Posteriormente se regresó a su bolsa. Se transportó bajo condiciones similares a las anteriores muestras y una vez en el laboratorio, la esponja fue procesada de la misma forma que el hisopo de Moore en el inciso anterior.

7.- AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp* DE SUPERFICIES VIVAS (MANIPULADORES).

El dispositivo Whirl Pak "Speci Sponge"^{MR} se humedeció en un 6 ml de solución salina al 0.85% se frotó la palma y dorso de las manos de las operadoras en turno de la planta y se depositó en su respectiva bolsa. A partir de este punto, todas las muestras se procesaron de igual forma.

MUESTRAS

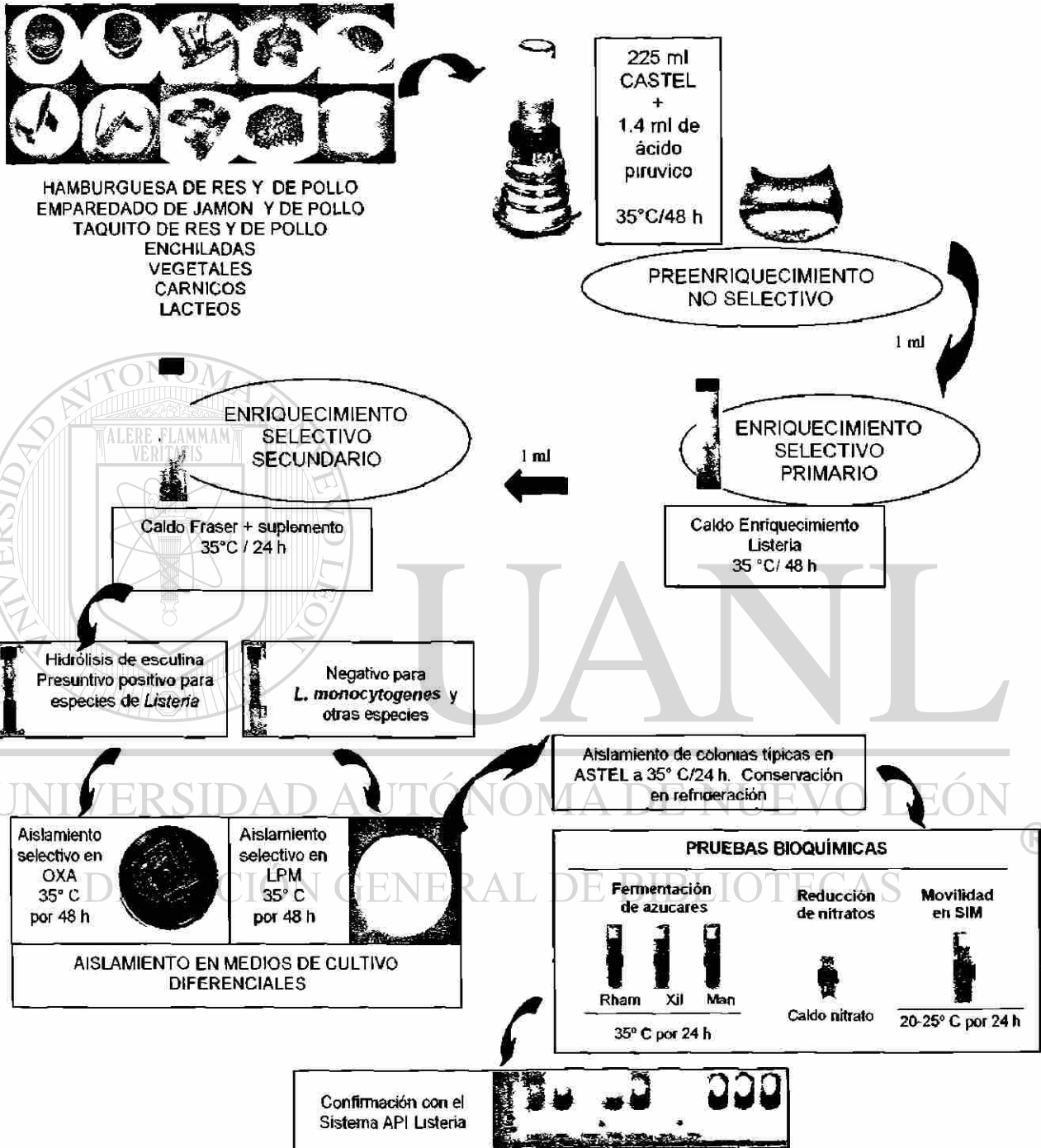


Fig. 1.- Diagrama de flujo de metodología para detección de *Listeria monocytogenes* y otras especies en materias primas y producto terminado.

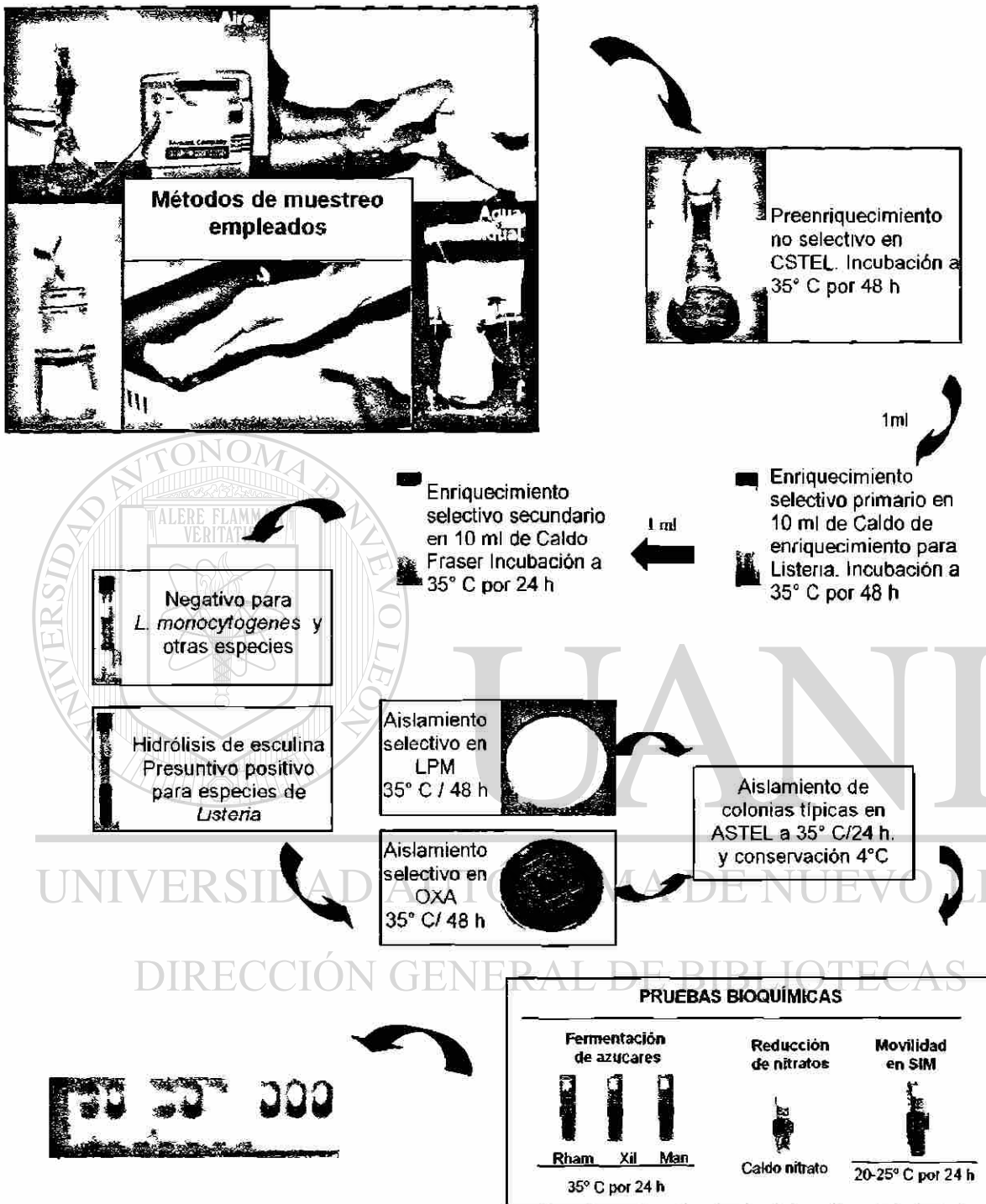


Fig. 2.- Diagrama de flujo de metodología empleada para detección de *Listeria monocytogenes* y otras especies en aire, superficies vivas e inertes agua potable y residual.

RESULTADOS

Un total de 580 muestras de materias primas, producto terminado, superficies vivas e inertes, agua potable, agua residual y ambiente, colectados en una planta ensambladora de alimentos congelados ubicada en el área metropolitana de Monterrey; N.L., fueron analizados para determinar la incidencia de *Listeria monocytogenes*.

Desglosando los grupos de muestras estudiadas podemos mencionar que las correspondientes a la materia prima consistieron de 30 productos de origen animal, donde se incluyeron, carne para taquitos, carne molida para hamburguesa, carne de pollo para hamburguesa, salchichas y otros; 30 productos de origen vegetal, que consistieron de diversos vegetales como: zanahoria, chile, cebolla, etc. y 30 productos de origen lácteo, representado por quesos. En este grupo de muestras fue donde se detectó la presencia de *L. monocytogenes* y esto correspondió a la materia prima de origen animal específicamente

carne molida, lo cual se determinó en un 3 % incidencia del microorganismo considerando el total de muestras analizadas solo de este tipo de productos. De igual manera, el mismo porcentaje de prevalencia se detectó en carne de ave para *L. innocua*. En el resto de las muestras analizadas no se

detectó la presencia de ninguna especie del género *Listeria* por lo que la materia prima de origen vegetal y los productos lácteos se reportaron con 0 % de prevalencia del género; estos resultados se representan en la figura 3.

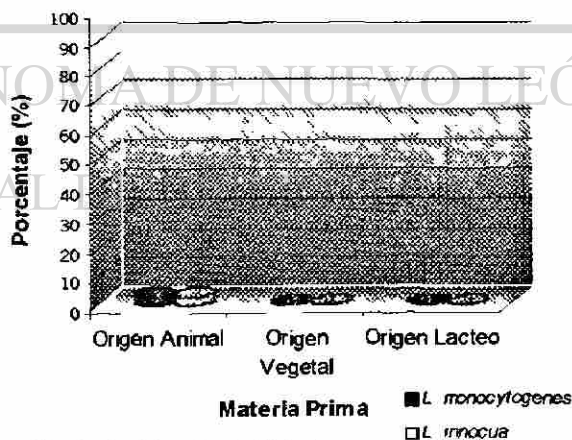


Fig. 3.- Incidencia de *Listeria* spp en materias primas empleadas para producción

Los productos terminados elaborados en la planta y analizados en este estudio, consistieron de alimentos manufacturados con relleno de queso (enchiladas y quesadillas); con relleno de carne de res (taquitos y hamburguesa); productos en los que la carne de pollo fué el principal ingrediente (emparedado y hamburguesa) y emparedado de jamón y queso. En este tipo de muestras se detectó a *L. monocytogenes* en los alimentos con relleno de queso, específicamente en las enchiladas, lo que representó un 2 % de incidencia del patógeno, en base a la cantidad de muestras que se estudiaron. Por otra parte, *L. innocua*, se detectó en mayor cantidad, en las enchiladas, quesadillas y emparedados de pollo. Estas muestras presentaron 12, 10 y 8 % de incidencia, respectivamente. En los cuatro productos restantes, mismos que fueron mencionados previamente no se logró detectar a ninguna de las especies del género *Listeria*, representando esto una incidencia nula de las mismas (Figura 4).

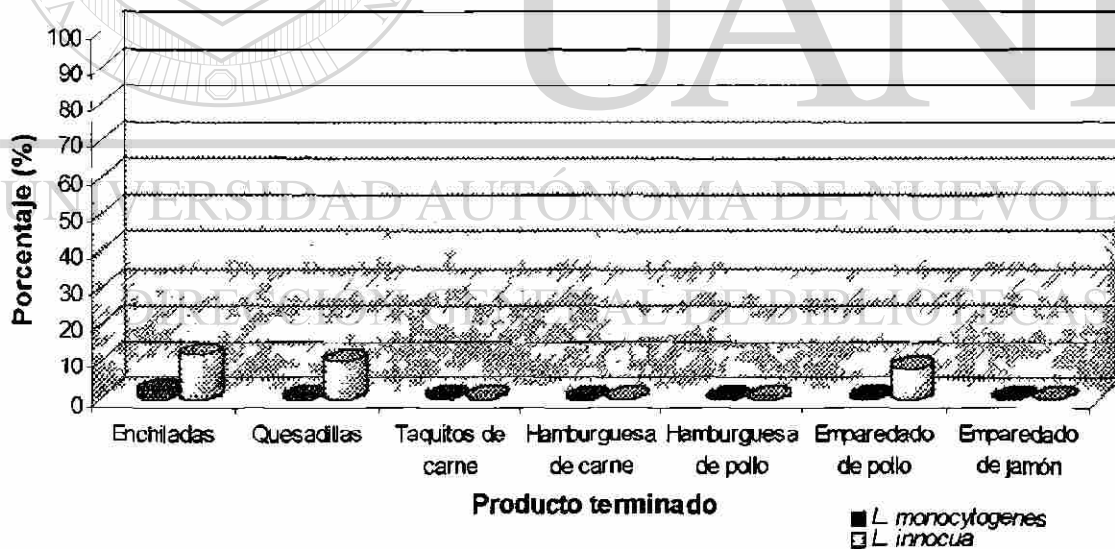


Fig. 4.- Incidencia de *Listeria spp* en producto terminado

Situación muy similar se obtuvo al analizar las muestras de superficies incluidas en el estudio y que consistieron de manos de manipuladores y de equipo de producción de la planta, en las cuales no fue posible detectar a *L. monocytogenes*, pero si a *L. innocua*, la cual solamente se detectó en una muestra del personal lo cual representó un 3 %. Esta cifra se incrementó hasta 36 % en las superficies inertes del área de producción. Cabe mencionar que dentro de este tipo de muestras se incluyeron las canaletas de drenaje, los sistemas de conservación a baja temperatura y las líneas de producción y por supuesto el mayor porcentaje de *L. innocua* se obtuvo en el primer tipo de muestras analizadas, tal como se observa en Figura 5.

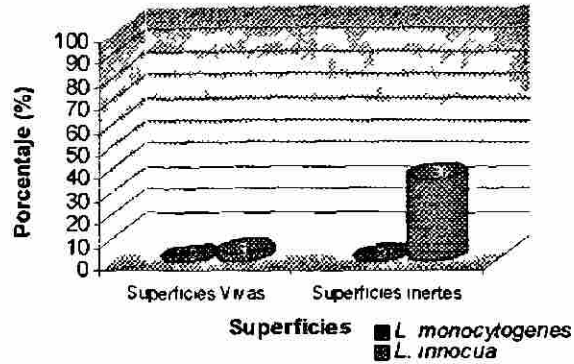


Fig. 5.- Incidencia de *Listeria spp* en superficies

Durante el transcurso del estudio surgió la inquietud de comparar la incidencia de los microorganismos que se estaban aislando, a dos niveles de la producción: nivel preoperativo y nivel operativo. El primero correspondió a las

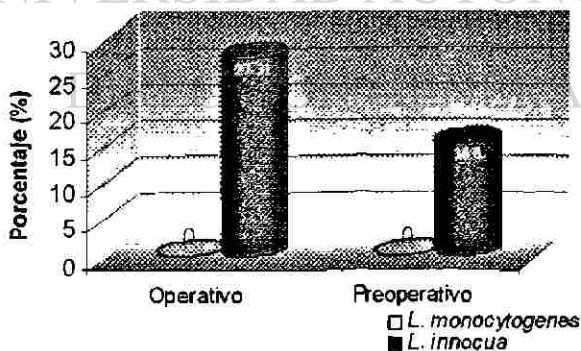


Fig. 6.- Incidencia de *Listeria spp* en la planta productora de alimentos en dos niveles de producción

muestras procesadas cuando la planta estaba recién sanitizada y el segundo a las obtenidas a medio turno del proceso de elaboración de productos. Esto condujo a determinar la presencia de *L. innocua* en un 15.6 % en el primer nivel, mismo que se incrementó hasta en 27.3 % en el segundo. La

detección de *L. monocytogenes* continuó siendo nula en esta fase del estudio. (Figura 6).

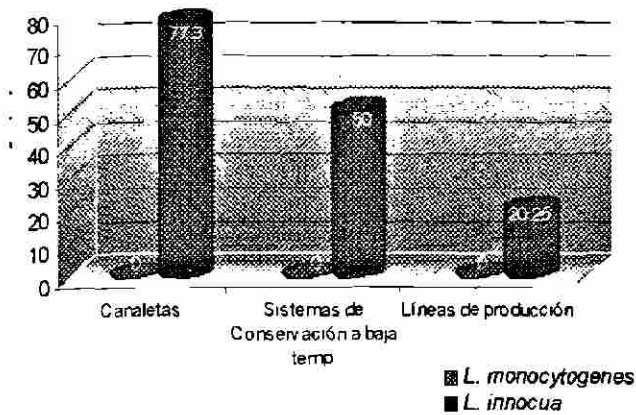


Fig 7.- Incidencia de *Listeria spp* en superficies inertes de la planta productora de alimentos

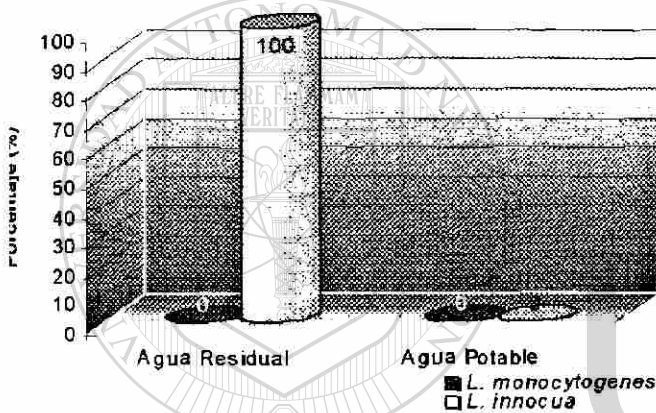


Fig. 8.- Incidencia de *Listeria spp* en agua empleada y generada en la planta productora de alimentos

Este mismo proceso se siguió en el área de cocina y cuarto de lavado en donde se presentó la misma situación, que en el caso anterior con respecto a *L. monocytogenes*, ya que esta no fue detectada y similarmente para *L. innocua* que fue detectada en un 28.6 % en ambos niveles de estudio, estos datos se representan en la figura 7.

La investigación *L. monocytogenes* en agua potable y agua residual de diferentes tomas y canaletas de la planta, se realizó en 60 muestras las cuales reflejaron una contaminación alta por *L. innocua* en el agua residual ya que se

presentó en el total de ellas, inversamente proporcional a estos resultados fueron los obtenidos en el agua potable, ya que la incidencia de *L. monocytogenes* y *L. innocua* no fue comprobada, como tampoco se pudo constatar su presencia en el ambiente de producción de la planta cuando se llevaron a cabo las determinaciones en las muestras de aire que fueron colectadas en el interior de la misma.

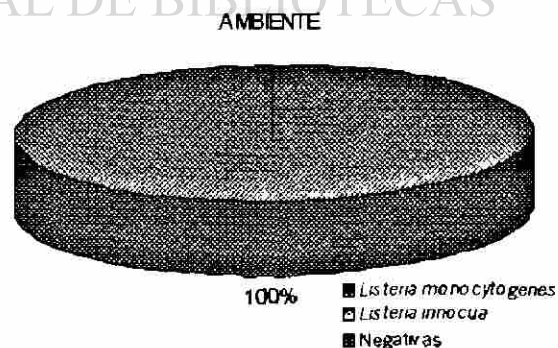


Fig. 9.- Porcentaje de incidencia de *Listeria spp* en muestras de ambiente interno de la planta

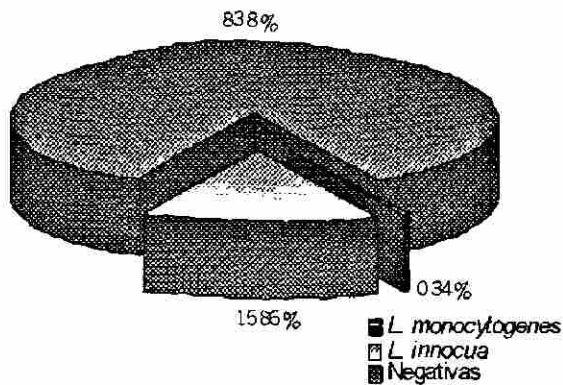


Fig. 10.- Distribución del total de muestras con relación a la presencia de *Listeria spp* en la planta estudiada

La distribución total de las muestras: 90 muestras de materias primas, 245 productos congelados listos para consumo después de un proceso de calentamiento, 155 muestras de superficies vivas e inertes, 60 muestras de agua potable y residual, y 30 de ambiente. El análisis de detección de la bacteria de importancia

condujo a la determinación de un porcentaje bajo de incidencia en la generalidad de las muestras ya que en el total de las mismas solo se obtuvo un 0.34 % de la presencia de *L. monocytogenes*. Caso contrario se observó en cuanto a la detección de otras especies del género en donde se detectó un 15.86 % de incidencia para *L. innocua*, saprófito considerado por algunos autores como indicador del patógeno buscado. Esta última especie se obtuvo en orden decreciente de porcentaje de incidencia en agua residual (100%), superficies inertes (36 %), producto terminado (6 %) y materia prima (1 %), aunque en este último solo se obtuvo una muestra positiva, estos datos se representan en la Figura 10.

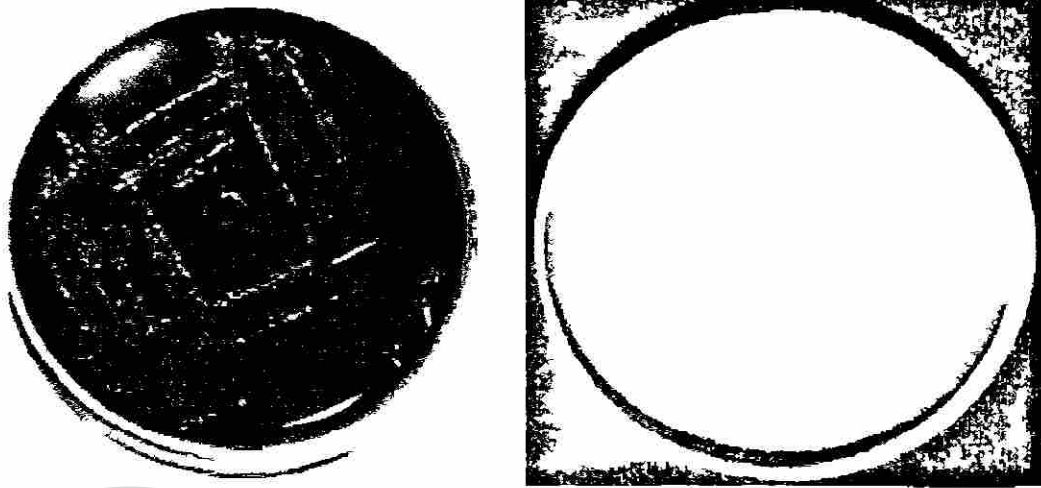


Fig. 11.- *Listeria monocytogenes* en Agar Oxford (Izquierda) y Agar LPM (Derecha)

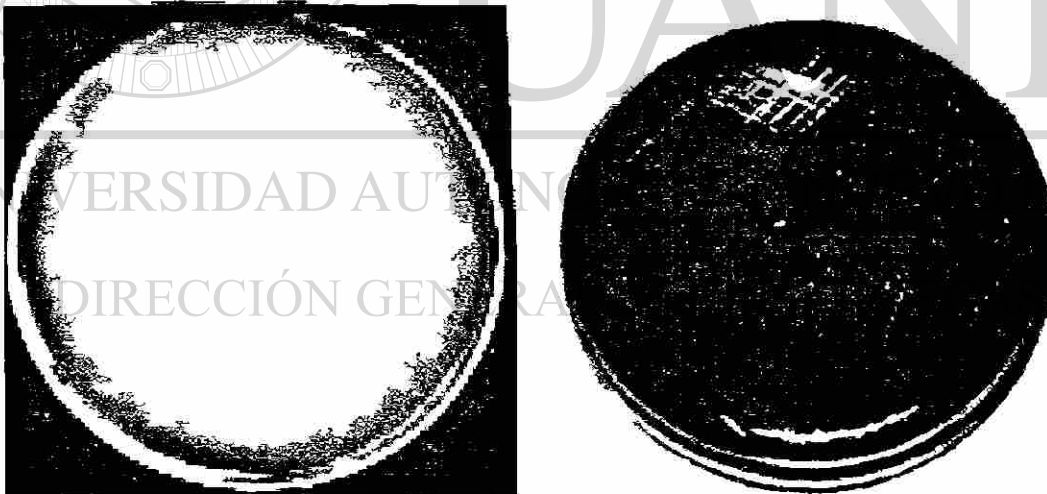


Fig. 12.- Crecimiento en Agar sangre: *Listeria monocytogenes* B hemolisis (Izquierda) y *Listeria innocua* (Derecha)

DISCUSIONES

El papel preponderante que ha tomado *Listeria monocytogenes* como microorganismo emergente productor de enfermedades transmitidas por alimentos ha conducido también a que se despierte un gran interés en plantas de alimentos, principalmente en aquellas en donde las condiciones de operación pueden ofrecer a la bacteria las condiciones adecuadas para que pueda instalarse, multiplicarse y contaminar los alimentos que se están produciendo; de ahí que el objetivo de este trabajo se enfocó a su determinación en los puntos críticos, previamente establecidos en una planta procesadora de alimentos congelados cuyo interés por conocer acerca de este microorganismo y de su incidencia en el ambiente de la planta, facilitó la colecta de todas las muestras que fueron incluidas para este estudio. Cabe mencionar que la planta estudiada tiene implementado el sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control con el cual previenen, minimizan o eliminan un riesgo que pueda afectar la salud de los consumidores. De tal manera, que al contar con un sistema de este tipo, se garantiza la producción de alimentos libres de microorganismos o cualquier otra entidad dañina y con ello la calidad sanitaria del producto se incrementa. La exportación de los alimentos de esta planta fue una de las principales ventajas que permitieron que la planta mostrar su interés en el trabajo ya que para la introducción de sus alimentos al país del norte exige la ausencia de *L. monocytogenes* en todas las muestras que cruzan la frontera .

De manera que el primer punto crítico de control establecido por ellos corresponde a la materia prima, a partir de la cual el microorganismo puede entrar en la planta procesadora procedente de los materiales crudos, como los vegetales, carne roja y de aves y otros productos. Los resultados que se obtuvieron en estas muestras indicaron la ausencia de *L. monocytogenes* en todos los productos de origen vegetal y en los productos de origen lácteo, lo cual indica que los

proveedores llevan a cabo un buen tratamiento térmico, que a su vez implican buenas prácticas de manufactura durante el proceso y después de éste, ya que estamos hablando de productos que proceden del campo, han sido lavados, desinfectados, pelados, troceados y cocidos como zanahorias, chícharos, brocoli, etc., y que han sido pasteurizados como en el caso de la leche y quesos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kaneko y cols, en 1999, quienes tampoco detectaron *L. monocytogenes*, pero sí encontraron otras especies del género *Listeria* en los vegetales y algunos alimentos cocidos. Resultados semejantes presentan Pingulkar et al, en el año 2001 al detectar un 100 % de incidencia de *Listeria spp* en vegetales de mercados locales, mientras que las ensaladas listas para comer mostraron su presencia en un 73 %, además *L. monocytogenes* se presentó en 7 muestras de 62 tomates, 5 de 10 hojas, 2 de 4 muestras de espinacas y 1 de 4 zanahorias.

En el caso de los productos de origen lácteo, los resultados que se observaron difieren en cuanto a la detección de *L. monocytogenes*, con lo reportado por Gohil, V.S., et al. (1994), quienes no encontraron incidencia de *Listeria spp.* en la leche pasteurizada, pero en cuatro muestras de queso blanco importado si se confirmó la presencia de *L. monocytogenes* . Por lo tanto también se presentó lo misma situación que con los vegetales ya que en las muestras de queso de la planta no se detectó ninguna especie del género de la bacteria.

En los productos de origen cárnico, se obtuvo un 1 % de muestras positivas para *L. monocytogenes*, principalmente en carne molida moldeada para hamburguesa. En este caso, quizás la probabilidad de aislamiento sea alta cuando se habla de carne moldeada, ya que en las carnes crudas se tiene bien documentada la presencia de *L. monocytogenes* tal como lo reporta, Piner, R, en 1992, quien realizó una extensa revisión de este patógeno en diversos tipos de carnes y demostró su presencia en muestras de carne de aves, res, cerdo, cordero, embutidos y en productos cárnicos ya procesados y Robinson, et al, en

1995, quienes la detectaron en carne de res y pollo crudo, frescos y congelados en 1 de 15 muestras de carne de res cruda, además de 34 de 107 muestras de carne precocida; pero las muestras analizadas correspondieron a lo que es la carne para carne para hamburguesa ya preparada es decir, esta carne solo se ensambla en el pan, se empaca y se congela, por lo cual, aunque el porcentaje obtenido haya sido bajo lo podemos considerar muy importante en virtud de que el alimento ya no sufre un nuevo tratamiento en la planta, sino que se procesa, se empaca y se congela y posteriormente se mantiene a la venta en refrigeración. Estas temperaturas, por lo tanto, pueden ser críticas para el alimento ya que *L. monocytogenes* puede permanecer viable y multiplicarse a niveles que pueden influir como causa de seguridad alimenticia, sobre todo si la hamburguesa se calienta someramente que generalmente se hace en microondas y en cuyo tratamiento se ha observado la supervivencia del patógeno cuando se encuentra en concentraciones de 1000 UFC y se calienta por 2 segundos (Espinoza, A y cols, 2000).

Otro punto considerado importante por la empresa correspondió a las superficies inertes que entran en contacto con los alimentos y que ellos consideran un eslabón en la cadena de transmisión para ciertos microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*; por lo tanto, lo colocan también como un segundo punto crítico de control. El análisis de estas superficies evidenció la ausencia de este patógeno, no así la de *L. innocua* que se determinó en un 36 %, principalmente en canaletas de drenaje, en donde obtuvo el mayor porcentaje de recuperación (77.3 %), disminuyendo éste a 50 % en los sistemas de conservación a bajas temperaturas y en las líneas de producción con un 20.25 %.

Cabe mencionar que en la planta de estudio se maneja el término de nivel preoperativo y nivel operativo, los cuales indican equipo listo para la producción y equipo durante la producción, respectivamente; en este caso la presencia de *L. innocua* se detectó en un 15.6 % antes de la producción y 27.3 % después. Las

líneas de producción 1,2 y 3 de la planta arrojaron incidencia elevada de éste saprófito específicamente en un 28.6 % y que fue obtenido también en las áreas de lavado y cocina. En dichas zonas, y en general en la planta, existe el ambiente húmedo y frío por lo que es fácil explicar el porque de tan alto porcentaje del microorganismo, en ellos. Aquí lo importante es que el patógeno no se detectó en este tipo de muestras. Sin embargo, algunos autores mencionan a *L. innocua* como indicador de la presencia de *L. monocytogenes*, entonces es posible que el alto porcentaje del saprófito esté indicando que *L.monocytogenes* está presente. Los resultados de este estudio, por lo tanto, provocan cierta controversia en dicha afirmación ya que nosotros no logramos aislar a *L. monocytogenes* aún a pesar de la alta incidencia de *L. innocua*. En otros estudios estos resultados son diferentes a los encontrados por Sammarco y cols, en 1997, ya que ellos detectaron *L. monocytogenes* en un 13.3 % en estropajos de pisos y 7.1 % en recipientes para lavado de manos, además determinaron otras especies de *Listeria* en áreas diferentes como fueron las paredes, y Rorvik, et al, en 1997 aislaron a *L. monocytogenes* en un 33 % del total de muestras y en alcantarillas se detectó al mismo en un 65 %; mientras que otras especies del género *Listeria*, se encontraron en 40% y 75 % respectivamente; confirmando lo que Doyle en 1997 enfatizó, que este microorganismo es más persistente en los alimentos debido a que crece formando biofilmes sobre superficies inertes como condensadores, paredes, techos y utensilios de limpieza. Además, Wong en 1998 menciona que *L. monocytogenes* sobrevive por periodos prolongados en acero inoxidable y bandas de goma, materiales comúnmente usados en equipo para procesamiento de alimentos. Estos biofilmes, según Watnick, et al. 2000, en la mayoría de los ambientes naturales, son asociaciones entre varios estilos de vidas microbiana y una superficie, la cual formará un microambiente favorable a los mismos y permitirá además de que éstos puedan desarrollarse sobre una gran cantidad de superficies húmedas, vivas o inertes, que no hayan sido adecuadamente sanitizadas. La presencia de estos biofilmes reducirá la efectividad de los sanitizantes, como el hipoclorito y peróxido de hidrógeno

12 % de *Listeria spp.* y de ellos un 7 %, presentó *L. monocytogenes* en 99 trabajadores encargados de la producción . Caso contrario a nuestros resultados ya que demuestran la ausencia de este patógeno, posiblemente debido a la educación sanitaria de los trabajadores y la aplicación de las prácticas de higiene que rigen esta empresa, además del uso adecuado de sanitizantes para lavado y desinfección de manos para eliminar mediante el lavado. En este sentido podemos afirmar que la encargada de calidad en la planta , sabía perfectamente su papel para con el personal del área de producción, ya que durante las fases del muestreo nos pudimos percatar de su insistencia para que el personal llevará a cabo adecuadamente su higiene personal.

Con respecto a los alimentos a base de tortilla de maíz o trigo con relleno de queso (enchiladas, quesadillas), o con relleno de carne de res y pollo o frijoles (flautas, hamburguesas, burritos, tornillos) , emparedados rellenos de ensalada de pollo y queso con jamón, además de otros productos similares. Nosotros obtuvimos resultados totalmente diferentes a los obtenidos por otros investigadores ya que ellos reportan productos cárnicos listos para su consumo en E.U.A, contaminados con este patógeno en un 12 % en 1987 y un 10 % en 1998, (Wilson, 1989); — así mismo Farber, en 1991, hace mención a ciertos brotes de listeriosis debido a hamburguesas contaminadas con *L. monocytogenes* ; Graw en 1992 detectó en 53 % a esta bacteria en muestras de productos cárnicos preparados, mientras que Hudson, J.A. et. al. (1992), cuantificaron en un 39.4 % de sus muestras estudiadas, la presencia de *Listeria spp.*, en alimentos cárnicos listos para comer y Levine y cols en el 2001 observaron que esta bacteria prevalece en bajos porcentajes en diversos productos cárnicos y de ave, listos para su consumo. Por lo tanto los alimentos que se analizaron están siendo preparados con rigurosas medidas higiénicas que impiden que la bacteria esté incidiendo en ellos y este resultado concuerda con los obtenidos por Francina y cols, (2001) los cuales reportan la ausencia de éste en alimentos listos para consumo a base de carne y ensaladas.

(Stewart, et al. 2000) , ya que estos poseen habilidad limitada para penetrar la capa protectora de los polímeros bacterianos que los recubre (Fatemi, et al, 1999). Por lo tanto representa doble importancia el estudio realizado en superficies inertes, ya que el proceso de sanitización está considerado como un punto crítico de control en cualquier planta procesadora. Los análisis arrojan una alta incidencia de *L. innocua* pero la ausencia del patógeno, principalmente en alcantarillas, equipos para conservación a temperaturas bajas y líneas de producción, también se observa que antes del proceso de alimentos los valores registrados son menores que cuando se está en proceso en cuanto al safrófito encontrado, lo que indica que la sanitización es medianamente efectiva, porque conforme transcurre el tiempo de manufactura, la acumulación de los restos de materias primas que pueden aportar contaminación cruzada con otros alimentos y superficies sucias provocan estos incrementos; aunque Ojeniyi, et al (2000), encontraron el patógeno *L. monocytogenes*, ellos ratifican que la limpieza y desinfección disminuyó la incidencia hasta un 6.4 % al detectar su prevalencia en un 25 a 41.4 %, además, Rijpens, et al, (1997) señalan que la presencia de *L. innocua* u otra especie no patogénica, se puede considerar como un indicador de condiciones no sanitarias, que mas tarde propicien el crecimiento o desarrollo de *L. monocytogenes*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Las superficies vivas (manipuladores) pueden jugar un papel significativo en la transmisión de patógenos, ya que la manipulación de los alimentos llevada a cabo con una pobre higiene personal, puede acarrear serios problemas de salud; al permitir que las manos contaminadas con microorganismos entéricas contaminen el producto que se está manufacturando; por tal razón la determinación de patógenos como *L. monocytogenes*, fue otro punto crítico de control que se estableció en la planta. Diversos autores, entre ellos, Snelling, A.M. et. al (1991), demuestran la sobrevivencia de este patógeno en las puntas de los dedos de los manipuladores de alimentos, así como los factores (lípidos y flora normal de la piel) que afectan la eliminación del organismo por el lavado de manos y la desinfección. Similarmente, Kerr, K.G. et .al., (1993) , cuantificaron un

En el caso de los productos con relleno de queso, se obtuvo un porcentaje bajo de incidencia de *L. monocytogenes* (0.5 %) y a *L. innocua* en un 12 %, lo cual sugiere que ocurrió contaminación desde la materia prima o durante el proceso, considerando que *L. innocua* es muy común y muy abundante en productos lácteos, según , Loessner, et al, 1991, y además posee la habilidad de sobrevivir a la manufactura y maduración de distintos quesos (Solano, et al, 1997). Esto posiblemente origine que su incidencia en este tipo de productos sea elevada, como lo menciona Olarte, et al, 1997, quienes detectan al patógeno en un 5.6 % en muestras de queso fresco en España , que al igual que Guerra y cols, en los meses de octubre 1998 a abril del 2000, encuentran *L. monocytogenes* en alimentos de rápido consumo a base de queso portugués maduro y semimaduro, en un 9 % de las muestras y otras especies del género *Listeria*. Por lo tanto es importante hacer hincapié que estos alimentos pueden actuar como vehículo de este microorganismos, lo cual ha sido perfectamente documentado por los diversos estudios que se han realizado, y en donde los alimentos a base de relleno de queso han sido involucrados en varios brotes de listeriosis que han sido comprobados por el Centro de Control de Enfermedades, principalmente al queso estilo mexicano.

El agua potable también se verificó como otra posible fuente de contaminación, ya que gran parte del proceso requiere de este fluido que es utilizado, ya sea como parte integral de la materia prima, para la sanitización, para consumo humano, para homogeneización de diferentes ingredientes, etc, La determinación del patógeno en este tipo muestras, no fue productivo, lo cual se esperaba, considerando su potabilización; pero la planta almacena este líquido y las condiciones por lo tanto pueden cambiar y con ello sufrir contaminación. Por lo que nuevamente el control microbiológico en la fábrica se hizo evidente .

El panorama cambió en el muestreo del agua residual, en donde se obtuvo una alta incidencia del género *Listeria*, principalmente, *L. innocua*, hecho que consideramos totalmente lógico ya que si ésta se obtuvo a nivel preoperativo y

operativo en la planta, en superficies inertes (alcantarillas, enfriadores) y en líneas de producción , también tenía que estar en el agua residual ya que éstas proceden de los lavados de equipo, utensilios y demás superficies para la fabricación de los alimentos, estos datos difieren a lo reportado por Watkins et al 1981, Guenich y Muller en 1984 y Al-Ghazali y Al-Azawi en 1986, quienes encontraron **L. monocytogenes** en aguas de río y afluentes industriales de mataderos, plantas de empaquetamiento y tratadoras de agua residual en diferentes etapas del proceso, demostrando que el género **Listeria** puede encontrarse constantemente en este tipo de agua y se confirma en nuestros resultados, al obtener una alta incidencia de **L. innocua**.

Finalmente, el ambiente interno de la planta puede servir como vehículo de transporte para infinidad de microorganismos y así llegar a contaminar materia prima, producto terminado, superficies que entran en contacto con el alimento y recontaminar espacios ya sanitizados, por lo que puede representar, un verdadero dolor de cabeza, si no se cuenta con un ambiente limpio e inocuo. Infinidad de autores señalan y demuestran que el aire puede estar contaminado con **L. monocytogenes**, tal es el caso de Lawrence y cols, que en 1995, aislaron 29 cepas del medio ambiente del área de procesamiento de aves y productos de aves; Pritchard, T.J. et al, en el mismo año, compararon la incidencia de la contaminación por **Listeria** del equipo, con la del medio ambiente de procesamiento de 21 plantas de lácteos, encontrando que el nivel de contaminación fue más alto en el medio ambiente (49.7 %) con respecto a las muestras de equipo (7.0 %), por lo que concluyen que la contaminación ambiental con **Listeria** no necesariamente se traduce en contaminación del equipo dentro de la misma planta sin embargo no se debe dejar de hacer énfasis en la limpieza y sanitización del medio ambiente de la misma; Fenlon y cols en 1996, reportan incidencia baja de **L. monocytogenes** en una amplia variedad de muestras ambientales asociadas con la producción inicial de un alimento y estos resultados son los que mas se acercan y concuerdan a las muestras, ya que nosotros no logramos detectar a la bacteria en el ambiente .

Por lo tanto, nuestros resultados que abarcaron todas las fuentes naturales relacionadas con la presencia y hábitat de *L. monocytogenes*, en la planta, demostraron baja incidencia del patógeno en la mayoría de las mismas, con excepción de la materia prima y producto terminado, situación que aunque no es grave, se antepone a la “ cero tolerancia “ que FSIS y otros organismos gubernamentales, incluyendo a los de nuestro país proponen en productos listos para consumo. Cabe mencionar que el Sistema HACCP implementado en la planta juega un papel importante en la misma y queda demostrando en los resultados que se obtuvieron, ya que al enfatizar en la certificación de proveedores y en las buenas prácticas de manufactura, se logrará la meta de cero tolerancia en los productos manufacturados no solo en la planta estudiada sino en cualquiera que provea de las condiciones para que la *L. monocytogenes* pueda medrar.

Todo este sistema implementado pensamos que ha sido de gran utilidad ya que a pesar de la alta incidencia de *L. innocua*, *L. monocytogenes* no ha sido capaz de establecerse lo cual es de gran ventaja considerando la cuestión de que es mejor prevenir su introducción que erradicarla.

CONCLUSIONES

Listeria monocytogenes, se detectó en 0.34 % en la totalidad de las muestras analizadas, principalmente en materia prima y producto terminado, aunque en la mayoría de las mismas no se encontró.

La especie del género *Listeria* que predomina con mayor porcentaje de aislamiento, es el saprófito *L. innocua*, de la cual se obtuvo alta prevalencia en superficies inertes, agua residual, producto terminado y materia prima, haciendo hincapié que durante el procesamiento de los alimentos su número se incrementó y que los procesos de sanitización resultan medianamente efectivos, porque disminuyen su número, pero no hasta tasa cero.

Los puntos críticos de control establecidos por la planta cumplen con la función correspondiente, mas sin embargo, se recomendó la implantación o establecer como puntos críticos las fuentes naturales de este patógeno, como lo son agua residual, superficies inertes y vivas, ambiente y procesos de sanitización.

Dado, que se determinó gran cantidad de muestras positivas en planta, para el género *Listeria*, podemos concluir que las condiciones de crecimiento para desarrollo del patógeno están establecidas y que de no seguir los principios del sistema HACCP y las buenas prácticas de manufactura, esto podría pasar en menor tiempo de lo esperado.

LITERATURA CITADA

Adams, C.E. 1990. HACCP: Use of HACCP in meat and poultry inspection. Food Technol. **5**: 169-170.

Al-Ghazali, M.R., S.K. Al- Azawi. 1986. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in a sewage treatment plant in Iraq. J. Appl. Bacteriol. **60** : 251 – 254.

Alvarez, M.B. and E.E Fernández . 1995. Fuentes de Contaminación de *Listeria spp.* durante el procesamiento de brócoli precocido y congelado. Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara, Jalisco. **A.3.A.**

Aureli, P. 1998. Las infecciones y las intoxicaciones alimentarias. Revista Filo Dieto Italia, **4**: 54

Beard III, T.D., 1992. HACCP and the home: the need for consumer education. Food Techno. 123-124.

Beumer, R.R., M.C. Giffel, E. Spoorenberg, F.M. Rombouts. 1996. *Listeria* species in domestic environments. Epidemiol Infect. **117**: 437-442

Beuchat, L.R., and J. H. Ryu. 1997. Produce and processing practices. Emerging Infectious Diseases. **3**: 1- 8.

Brashears, M.M., D.E. Burson, E.S. Dormedy, L.Vavk, S.R. McKee, W. Fluckey and M. Sánchez. 2001. HACCP Implementaton and Validation in Small and Very

Small meat and Poultry Processing Plants in Nebraska. Dairy, Food and Environmental Sanitation. **21**: 1-5

Buchanan, R.L., W.G. Damert, R.C. Whiting, M. Van Schothorst. 1997. Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationships for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. J. Food Prot. **60**: 918-922.

Cotton, L.N., C.H. White. 1992. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in dairy plant environments. J. Dairy Sci. **75**: 51-57.

De Valk, H. , Vaillant, V., Jacquet, C., Rocourt, J., Le Querrec, F., Stainer, F., Quelquejeu, N., Pierre, O., Pierre, V., Desenclos, J.C., Goulet, V. 2001. Two consecutive nationwide outbreaks of Listeriosis in France, October 1999-February 2000. Am J Epidemiol. **154**: 944-950

Dillon, R.M. and T.R. Patel. 1992. *Listeria* in seafoods: a review. J Food Prot. **55**: 1009-1015

Doyle, M.P. 1997. The microbiology of *Listeria monocytogenes* as a food pathogen. Center for Food Safety and Quality Enhancement, University of Georgia. GA. 1109

Dunait, G.E. and E.P. Krynsky . 1992. Managing the pesticide challenge: a food processor's model. Food Techno. 72-76

Espinoza M.A. y A. Puente. 2001. Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos congelados y sometidos a diferente tiempos de calentamiento en horno de microondas. Tesis. Químico Bacteriólogo Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas . Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L.

Farber, J.M. and P.I. Peterquin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. **55**: 476-551

Fatemi, P. And J.F. Frank. 1999. Inactivation of *Listeria monocytogenes* / *Pseudomonas* Biofilms by Peracid sanitizers. J. Food Prot. **62**: 761-765

Fenlon, D.R., Wilson, J., Donachie, W. 1996. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. J. Appl. Bacteriol. **81**: 641-650

Fleming, D.W., S.W. Cochi, K.L. MacDonald, J. Brondum, P.S. Hayes, B.D. Plikaytis and A.L. Ringold. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. New England J. Med. **7**: 404

Food Safety and Inspection Service. 1999. FSIS: Strategies for addressing *Listeria monocytogenes*. pp: 1 -6.

Francina, M.M. and Alexander Von Holy. 1999. Microbiological Quality and safety of Ready-to-Eat Street vended Foods in Johannesburg, South Africa. J. Food Prot. **62**: 1278-1284

Frazier, W.C., D.C. Westhoff. 1993. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia, S.A.

Garrett III, E.S. and M. Hudak – Ross. 1990. HACCP: Use of HACCP for seafood surveillance and certification. Food Techno. **45**: 159-165.

Gohil, V.S., M.A. Ahmed, R. Davies and R.K. Robinson. 1995. Incidence of *Listeria spp.* in retail foods in the United Arab Emirates. J. Food Prot. **58**: 102

Graw, F.H. and P.B. Vanderlinde. 1988. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged beef . P. 518-519. In Proceeding of the 34th International Congress of Meat Science a Technology. Part B, Brisbane, Australia.

Graw, F.H. and P.B. Vanderlinde. 1992. Ocurrance, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacum-packaged processed meats. J Food Prot. **55**: 4-7

Guenich, H., H.E. Muller. 1984. Isolation and quantitative determination of *Listeria monocytogenes* in raw and biologically treated wastewater. Zentralb Bakteriol Mikrobiol Hyg I Abt. Orig. B. 179-266.

Guenich, H.H, H.E. Muller, A. Schretten-Brunner, H.P. Seeleiger. 1985. The ocurrance in different *Listeria* species in municipal waste water. Zentralb Bakteriol Mikrobiol Hyg. 181: 563-565.

Guerra, M.M., J. McLauchlin, F. A. Bernardo. 2001. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. Food Microbiology. **18**: 423-429.

Hitchins, A.D. , Whitting, R.C. 2001. Food-borne *Listeria monocytogenes* risk assesment. Food Addit Contam. 12: 1108-1117.

Ho, J.L., K.N. Shands, G. Friedland, P. Eckind and D.W. Fraser. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. Arch. Inter. Med. **146**: 520

Hudson, J.A., S.J. Mott, K.M. Delacy and A.L. Edrigde. 1992. Incidence and coincidencia of *Listeria spp.*, motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat fleshfoods. Int. J. Food Microbiol. **2**: 99-108

Institute of Food Service & Technology UK. 1998. Current Hot Topics. *Listeria monocytogenes* in Cheese. pp: 1-3.

Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 1993. El Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control en la Inocuidad de los Alimentos. pp: 1-25.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1991. El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos, su aplicación a las industrias de alimentos. Ed. ACRIBIA, S.A. pp: 213-218.

James, M.J. 1992. Microbiología Moderna de los Alimentos. Editorial ACRIBIA. Tercera Edición. 601-649

Jermimi, M., F.L. Bryan, R. Schmitt, C. Mwandue, J. Mwenya, M.H. Zyuulu, E.N. Chiluya, A. Mataba, A.T. Hakalima and M. Michael. 1997. Hazards and critical control points of vending operations in a city in Zambia. *J. Food Prot.* **60**: 288-299.

Kalish, F. 1991. Extending the HACCP concept to product distribution. *Food Techno.* 119-123.

Kaneko, K.I., H. Hayashidani, Y. Ohtomo, J. Kosuge, M. kato, K. Takahashi, Y. Shiraki, and Masuo Ogawa. 1999. Bacterial Contamination of Ready-to-Eat Foods and Fresh products in Retail shops and Food factories. *J. Food Prot.* **62**: 644-649.

Kaneko, K.I., H. hayashidani, K.Takahashi, Y. Shiraki, S. Limawongpranee and Masuo Ogawa. 1999. Bacterial Contamination in the Environment of Food Factories Processing Ready-to-Eat Fresh Vegetables. *J. Food Prot.* **62**: 800-804

Karr, K.J., A.N. Maretzi and S.J. Knabel. 1994. HACCP: Meat and poultry companies asses USDA's hazard analysis and critical control points system. Food Techno. 117-122.

Kerr, K.G., O. Birkenhead, K. Seale and J. Major. 1993. Prevalence of *Listeria spp* an the hands of food workers. J. Food Prot. **56**: 525- 527.

Knabel, S.J. 1995. Foodborne illness: role of home food handling practices. Scientific Status Summary. Food Techno. **49**: 114-132.

Lammerding, A.M. and G.M. Paoli. 1997. Quantitative risk assessment: an emerging tool for emerging foodborne pathogens. Emerging infectious Diseases. **3**: 1-7.

Lawrence, L.M. and A. Gilmour. 1994. Incidence of *Listeria spp* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation. By multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol. **60** : 4600-4604.

Lawrence, L., and A. Gilmour. 1995. Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated from Poultry Products and From the Poultry-Processing Environment by Random Amplification of Polymorphic DNA and Multilocus Enzyme electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 2139-2144.

Levine, P., Rose, B., Green, S, Ransom, G., Hill, W. 2001. Pathogen testing of ready-to-eat meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States, 1990 a 1999. J. Food prot. **64** : 1188-1193.

Lida, T.K., M. Nakama, Kokubo, Y., Maruyama, T., Kaneuchi, C. 1998. Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animal and foods. *J. Vet. Med. Sci.* **60**: 1341-1343.

Loessner, M.J. and M. Busse. 1990. Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1912-1918

Lovett, J. and R.M. Twedt. 1986. Bacteria associated with foodborne diseases: *Listeria*. Scientific Status Summary. *Food Technol.* **42**: 16-24.

Lowry, P.D. and L. Tiung. 1988. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat and meat products factors affecting distribution. *Meat Sci. Technol.* 528-530. In Press.

MMWR. 2001. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese- North Carolina, October 2000-January 2001. *Morb Wkly Rep.* **50**: 560-562.

MacGowan, A.P., Bowker, k: maclauchlin, J., bennett, P.M., Reeves, D.S. 1994. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria spp.* in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *Int. J. Food Microbiol.* **21**: 325-334.

Miller, M.F., M.A. Carr, D.B. Bawcon, C.B. Ramsey and I.D. Thompson. 1997. Microbiology of pork carcasses from pigs with differing origins and feed withdrawal times. *J. Food Prot.* **60**: 242-245.

Miller, A.J., R.C. Whiting and J.L. Smith. 1997. Use of risk assessment to reduce Listeriosis incidence. *Food Technol.* **51**: 100-103.

Ojeniyi, B., Christensen, J., Bisgaard, M. 2000. Comparative investigations of *Listeria monocytogenes* isolated a turkey processing plant, turkey products, and from human cases of listeriosis in Denmark. *Epidemiol Infect.* **125**: 303-308.

Olarte, C., S. sanz, E. Gonzalez-Fandos, and P. Torre. 1999. Microbiological and physicochemical characteristics of cameros cheese. *Food Microbiology.* **16**: 124

Palumbo, S.A., and A.C. Williams. 1990. Efect of temperature, relative humidity, and suspending menstrua on the resistance of *Listeria monocytogenes* to drying. *J. Food Prot.* **53**: 377-381

Palumbo, S.A., A. Pickard, J.E. Call. 1999. Fate of gram-positive bacteria in reconditioned, pork-processing plant water. *J. Food Prot.* **62**: 194-197

Periódico El Norte. 2001. Sección D Cultural. Página 1 D.

Pingulkar, K., Kamat, A., Bongirwar, D. 2001. Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. *Int. J. Food Sci Nutr.* **52**: 15-23.

Pinner, R.W., A. Schuchat, B. Swaminathan, P.S. Hayes, K.A. Deaver, R.E. Weaver, B.D. Pilkaytis, M. Reeves, C.V. Broome, J.D. Wagner. 1992. Role of foods in sporadic listeriosis II. *JAMA.* **267**: 2046-2050

Pritchard, T.J., Flanders, k.J. , donelly, C.W. 1995. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. *Int. J. Food Microbiol.* **26**: 375-384.

Ripjens, N.P., G. Jannes and Lieve M.F. Herman. 1997. Incidence of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in Ready-To-eat chicken and Turkey Products

Determined by Polymerase Chain Reaction and Line Probe assay Hybridization. *J. Food Prot.* **50**: 548-559.

Robinson, R.K., S. Virendra, M.A. Ahmed and R. Davies. 1995. Incidence of *Listeria spp* in Retail Foods in the United Arab Emirates. *J. Food Prot.* **58**: 102

Rorvik, L.M., E. Skejerve, B.R. Knudsen, M. Yndestad. 1997. Risk factors for contamination of smoked salmon with *Listeria monocytogenes* during processing. *Int J. Food Microbiol.* **37**: 215-9

Salvat, G., M.T. Toquin, Y. Michel. P. Colín. 1995. Control de *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of listeriosis outbreak in France. *Int. J. Food Microbiol.* **25**: 75-81.

Sanmarco, M.L., G. Ripabellis, A. Ruberto, G. Lannitto and C.M. Grasso. 1997. Prevalence of Salmonellae, Listeriae y Yersiniae in the slaughterhouse environment and work surfaces, equipment and workers. *J. Food Prot.* **60**: 367-371.

Schlench, W.F., P.M. Lavigne, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldase, A.J. Wurt, A.W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls and C.N. Broome. 1983. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *New England J. Med.* **4**: 203

Schmitt, R., F.L. Bryan, M. Jermini, E.N. Chilutya, A.T. Hakalima, M. Zyuulu, E. Mfume, E. Mwandwe, E. Mullungushi and D. Lubast. 1997. Hazards and critical control points of food preparation in home in which persons had diarrhea in Zambia. *J. Food Prot.* **60**: 161-171.

Schuchat, A., Deaver, J.D. Wagner, B.D. Pikaytis, L. Mascola, R.W. Pinner, A.L. Reingold, C.V. Broome. 1992. Role of foods in sporadic listeriosis I. JAMA. **267**: 2041-2045

Schwartz, B., C.V. Broome, G.R. Geri, A.W. Highower, C.A. Ciesielski, S. Gaventa, B.G. Gellin, L. Mascola. 1988. Association of Sporadic Listeriosis with Consumption of Uncooked Hot Dogs and Undercooked Chicken. The Lancet. **2**: 779-782.

Secretaría de salud. 1993. Manual de Aplicación del Análisis de Riesgos, Identificación y Control de Puntos Críticos. pp: 1-50.

Silliker, J.H. 1986. New bacteria and the news. Food Technol. 16-26.

Smoot, L.M., and M.D. Pierson. 1998. Effect of Environmental Stress on the Ability of *Listeria monocytogenes* to Attach to Food Contact Surfaces. J. Food Prot. **61**: 1293-1298.

Snelling, A.M., K.G. Kerr and J. Hentaje. 1991. The Survival of *Listeria monocytogenes* on fingertips and factors affecting elimination of the organism by handwashing and disinfection. J. Food Prot. **54**: 343-348.

Soriano, J.M., J.C. Moltó, and J. Mañes. 2001. *Listeria* Species in Raw and Ready-to-Eat Foods from Restaurants. J. Food Prot. **64**: 551-553.

Stewart, P.S., F. Roe, J. Rayner, J. G. Elkins, Z. Lewandowski, U.A. Ochsner and D.J. Hassett. 2000. Effect of Catalase on Hydrogen Peroxide Penetration into *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Appl Environ Microbiol. **66**: 836-838

Tecnología de los Alimentos, Industria y Mercado. 1998. Conciencia limpia.

Tobia, M.B., G.B. Mengoni and H.S. Pellon. 1997. *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria spp.* in termoprocessed products. Magazine Argentina de Microbiología. **29**: 15

Van del Elzen, A.M., J.M. Snijders. 1993. Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*. Vet Q. **15**: 143-145.

Watkins, J. and K.P. Sleath. 1981. Isolation and enumeration of *L. monocytogenes* in a sewage sludge and river water. J. Appl Bacteriol. **50**: 1-9

Watnick, P. And R. Kolter. 2000. Minireview: Biofilm, City of Microbes. Journal of bacteriology. **182**: 2675-2679

Whyte, P., J.D. Collins, K. McGill, C. Monahan, and H.O'Mahony. 2001. Distribution and Prevalence of Airborne Microorganisms in Three Commercial poultry Processing Plants. J. Food Prot. **64**: 388-391

Wilson, I.G. 1995. Ocurrence of *Listeria* especies in ready to eat foods. Epidemiol. Infect. **3**: 519-526

Wilson, I.G. 1996. Ocurrence of *Listeria* species in prepacked retail sandwiches. Epidemiol Infect. **117**: 89-93

Wong, A.C. 1998. Biofilms in food processing environments. J. Dairy Sci. **81**: 2765-2770

