

Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Dirección Ejecutiva, en relación con la aplicación de altas presiones en carne y productos cárnicos.

Núm. Referencia: AESA-2003-007

Documento aprobado por el Comité Científico en sesión plenaria el 12 de Mayo de 2004

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver (Presidente). Juan José Badiola (Vicepresidente). Arturo Anadón Navarro, Margarita Arboix Arzo, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Francesc Centrich Escarpenter, José Luis García López, M^o Luisa García López, Manuela Juárez Iglesias, Manuel Martín Esteban, Juan Antonio Ordóñez Pereda, Andrés Otero Carballeira, Fernando Rodríguez Artalejo, Elías Rodríguez Ferri, José Manuel Sánchez Vizcaíno Rodríguez, Vicente Sanchís Almenar, Gregorio Varela Moreiras, Gonzalo Zurera Cosano.

Grupo de Trabajo

Juan A. Ordóñez Pereda (coordinador)
Gonzalo Zurera Cosano
Albert Bosch Navarro
Andrés Otero Carballeira
Buenaventura Guamis López (experto externo)

Resumen

La aplicación de altas presiones hidrostáticas es un proceso físico no térmico que se puede utilizar para desactivar ciertos microorganismos presentes en los alimentos para lo que se utilizan habitualmente presiones comprendidas entre 300 y 700 MPa. Es una tecnología que data de finales del siglo XIX aunque puede considerarse que, desde un punto de vista comercial, su estudio, desarrollo y aplicación a los alimentos comenzó hace unos cuatro lustros, existiendo en la actualidad una abundante bibliografía acerca del efecto de las altas presiones en la viabilidad microbiana y en las propiedades funcionales de los componentes de los alimentos. Los microorganismos pueden ordenarse en relación con su manorresistencia, de menos a más resistentes, en mohos y levaduras → bacterias Gram negativas → virus con envoltura → hongos → bacterias Gram positivas → virus desnudos → esporas bacterianas. Aparte de la manorresistencia intrínseca de cada microorganismo, son muchos los agentes y factores que influyen en la letalidad de las altas presiones. Los más importantes quizás sean el nivel de presurización, la temperatura y el pH aunque en un segundo lugar se pueden colocar otros muchos, como tiempo de presurización, ingredientes, agentes antimicrobianos (bacteriocinas, antisépticos, etc.) presentes, etc.

Una de las aplicaciones potenciales del tratamiento de los alimentos con altas presiones es la posibilidad de destruir microorganismos alterantes y patógenos para, respectivamente, ampliar su vida útil o conseguir un producto final seguro. En primer lugar, hay que apuntar que tanto desde el punto de vista tecnológico como del sanitario cabe decir que, debido a la gran manorresistencia que presentan las bacterias esporuladas, las altas presiones, en el estado actual de desarrollo, no parece que puedan aplicarse para conseguir la esterilidad comercial de los alimentos. La aplicación de altas pre-

siones queda, por tanto, restringida a la higienización (equivalente a pasteurización) de los alimentos, lo que implica que los microorganismos a tener en cuenta principalmente son los patógenos no esporulados. No cabe duda que, al tiempo, se reduciría la carga de microorganismos alterantes, en especial la microbiota aerobia Gram negativa, con lo que se conseguiría un aumento de la vida útil del producto final refrigerado. Se plantea, en definitiva, analizar, a la luz de los conocimientos actuales, si el tratamiento de la carne y productos cárnicos con altas presiones es apropiado para conseguir una eficaz protección del consumidor (en relación con los riesgos de origen microbiano), en las condiciones actuales de la sociedad europea y determinar en qué circunstancias se alcanzarán los correspondientes objetivos de seguridad alimentaria (FSO).

Teniendo en cuenta la manorresistencia de los diferentes microorganismos de interés sanitario descrita en distintas publicaciones puede concluirse que los microorganismos que alcanzan mayor relevancia son: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. De estos, se descarta *Staph. aureus* como microorganismo "diana" debido a que su crecimiento es fácil de controlar en productos refrigerados.

De acuerdo con las dosis infectivas de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, la gravedad de la enfermedad que ocasionan, los datos acerca de los brotes que han ocurrido, los criterios microbiológicos propuestos y las características culturales de cada bacteria, se ha concluido que para conseguir, en cada caso, el correspondiente FSO en productos cárnicos crudos y en productos RTE se requeriría un tratamiento que logre, respectivamente, 4,4 y 2,4 reducciones decimales en el caso de *E. coli* O157:H7 y de 6 y 4 reducciones decimales en el de *L. monocytogenes*.

A la vista, por una parte, de la resistencia en matrices alimentarias de *E. coli* O157:H7 frente a la acción letal de las altas presiones y, por otra, el FSO ($-2,4 \log_{10}$ u.f.c. g^{-1}) que se requiere alcanzar (equivalente a 4,4 reducciones decimales con los niveles de contaminación que pueden esperarse en productos crudos) para conseguir, desde un punto de vista microbiológico, un producto cárnico seguro, puede concluirse que se necesitarían tratamientos superiores a 600 MPa en los productos cárnicos crudos. En el caso de productos RTE sería suficiente un tratamiento de 300 - 400 MPa, dado que en este caso el tratamiento tendría que reducir la tasa de *E. coli* O157:H7 sólo 2,4D. Los valores correspondientes para *L. monocytogenes*, con un FSO de 10^2 u.f.c. g^{-1} , son presurizaciones superiores a 600 MPa (reducción de 6D) para productos crudos y de 500 MPa (reducción de 4D) para los RTE.

Es difícil, pues, conseguir los FSO para ambas bacterias en un producto crudo. Sin embargo, las altas presiones pueden ser muy útiles para librar al mercado productos RTE seguros.

Palabras clave

Altas presiones, carne, productos cárnicos, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, seguridad alimentaria.

1. Desarrollo y fundamentos de las altas presiones

Las altas presiones isostáticas se conocen desde finales del siglo XIX (Hite, 1899) y principios del siglo XX (Hite y col., 1914; Larson y col., 1918). Ya en ese tiempo se informó que las bacterias vegetativas se podrían inactivar tratándolas a presiones de 400 a 600 MPa. Sin embargo, apenas progresaron las investigaciones durante un largo periodo de tiempo porque en esa época no era posible la construcción de equipos fiables y hubo que esperar al desarrollo de la cerámica industrial que utilizó estos equipos para la compactación de materiales (Sale y col., 1979) y para fabricar equipos que posteriormente se aplicaron a los alimentos. Debido, por una parte, a la demanda de alimentos mínimamente procesados, exentos de aditivos y microbiológicamente seguros y, por otra, al gran desarrollo de los aspectos ingenieriles de los equipos de altas presiones, sobre todo a partir de 1982, se reactivaron los estudios con los trabajos realizados por el grupo de Knorr en la Universidad de Delaware (Knorr, 2000) y en 1989 la Universidad de Kyoto y el Ministerio de Agricultura, Bosques y Pesquerías de Japón desarrollaron un proyecto coordinado para la construcción de un equipo de altas presiones para su uso en la industria alimentaria (Johnston, 1995), apareciendo en el mercado japonés alrededor de 1990 ciertos productos (mermeladas, zumos de frutas) tratados por altas presiones (Ledward, 1995). En Europa a partir del Congreso celebrado en "La Grand Motte" en Francia, en 1992 se constituyeron los primeros grupos que comenzaron a investigar esta tecnología en los que fueron incluidos dos grupos españoles (el CER Planta de Tecnología dels Aliments de la Universidad Autónoma de Barcelona en 1992 y el Instituto del Frío del CSIC en 1994). Desde esas fechas, y sobre todo en la última década, se han publicado innumerables trabajos y hoy se conoce razonablemente bien la manorresistencia de los microorganismos de mayor interés en Tecnología de los Alimentos, incluidos los productores de infecciones e intoxicaciones alimentarias aunque existen algunas lagunas acerca de la cinética de inactivación y los mecanismos íntimos de la acción letal de las altas presiones.

El término "altas presiones" es confuso a no ser que se relacione con alguna presión conocida, por ejemplo, en la zona baja, la atmosférica (0,1 MPa) o, en las altas, la profundidad donde reposa el "Prestige" (alrededor de 30 MPa) o las simas oceánicas más profundas (aprox. 100 MPa). Estas son muy bajas si se tiene en cuenta los 5 – 6 GPa que se utilizan en la industria del diamante artificial (Crossland, 1995) o algo menos si se comparan con las que pueden aplicarse a los alimentos cuyo intervalo está comprendido entre 100 MPa y 1000 MPa (Ledward, 1995) aunque en la industria alimentaria las altas presiones que se utilizan habitualmente para la higienización de alimentos se sitúan en el intervalo de 300 – 1000 MPa.

Los efectos de las altas presiones descansan en dos principios; uno el de Chatelier que indica que cualquier fenómeno que va acompañado de una disminución de volumen se verá potenciado cuando se aplica presión o, en otras palabras, cuando se aplica una fuerza a un sistema, éste responde tratando de amortiguar la fuerza. El otro, el principio de Pascal, que predice que la presión aplicada a un fluido en un punto se transmite de forma instantánea y homogénea a los restantes, independientemente del tamaño y la geometría del medio; es lo que se conoce como presión isostática.

Los fundamentos, el desarrollo, el equipo y los efectos de las altas presiones en los alimentos y sus componentes han quedado descritos en numerosas revisiones a las que se remite al lector para

ampliar conocimientos acerca de esta tecnología (Ledward y col., 1995; Tewari y col., 1999; Farkas y Hoover, 2000; Barbosa-Cánovas y Gould, 2000; Yuste y col., 2001; Palou y col., 2002; Balasubramaniam, 2003).

2. Cinética de desactivación microbiana por las altas presiones, mecanismo de acción y factores de que depende

Los primeros experimentos para dilucidar la cinética de destrucción de los microorganismos por las altas presiones se hicieron imitando los modelos muy bien conocidos de los tratamientos térmicos, es decir, representando, a presión constante, el logaritmo de supervivientes frente al tiempo de tratamiento. Es así como puede verse en numerosas publicaciones, donde se ofrecen los respectivos valores D (tiempos de reducción decimal). Sin embargo, algunos autores admiten que la naturaleza de la cinética de desactivación por las altas presiones difiere de la de la muerte térmica y otros tipos de tratamientos (Earnshaw, 1995; Isaacs y col., 1995), pudiendo variar incluso entre cepas de la misma especie (Simpson y Gilmour, 1997a; Tay y col., 2002) y de la presión que se aplique (Simpson y Gilmour, 1997a). En los tratamientos térmicos se asume que la muerte de microorganismos es log-lineal con el tiempo. Éste ha sido el enfoque aplicado durante muchos años en la industria y ha probado ser satisfactorio. Sin embargo, se han encontrado desviaciones a esta linealidad, lo que ha provocado que actualmente se estén revisando de nuevo. En los tratamientos de alta presión, estas desviaciones suelen ser más comunes y se caracterizan por un pronunciado "efecto de cola". Por lo tanto, las tablas clásicas de t-T (tiempo-temperatura) se substituyen por tablas P-t-T (presión-tiempo-temperatura), considerando además el tiempo de descompresión y el tiempo necesario para alcanzar la presión deseada. La cinética de desactivación puede presentar variaciones significativas entre distintas cepas de una misma especie y se puede considerar por supuesto que las curvas son diferentes a las distintas presiones aplicadas. Además, hay que añadir que las altas presiones producen daños subletales en alguna fracción de la población microbiana (Pettersen y col., 1995) que, tras un periodo de adaptación, puede recuperarse y multiplicarse de nuevo en el alimento (Smelt, 1998; Mussa y col., 1999; Yuste y col., 1999), lo que adquiere gran importancia cuando se estima la eficacia del tratamiento.

Las gráficas de supervivencia que se han obtenido en los distintos estudios son de diversa naturaleza.

- En unas, se advierte una marcada reducción, unas veces siguiendo una cinética de primer orden y otras no, del número de viables en los primeros minutos de tratamientos para, después, pasar a otro tramo con una pendiente menor. Así se ha observado, por ejemplo, para *Staphylococcus carnosus* (Earnshaw, 1995). Se ha explicado asumiendo la existencia de una subpoblación más sensible que se destruiría antes que una segunda subpoblación más manorresistente.
- En algunas, se observa un "hombro" inicial para después seguir un curso logarítmico o *cuasi* logarítmico. Este comportamiento se ha detectado en estudios con *Listeria monocytogenes* (Ritz y col., 2000) que se podría explicar, al igual que en los tratamientos térmicos, por la formación de agregados celulares y por la protección por contacto entre célula y célula (Cerf, 1977).
- En otras, el modelo de destrucción que muestra la gráfica se desvía de la linealidad y en el tramo final se observan "colas" que demuestran una subpoblación microbiana con una marcada resis-

tencia a las altas presiones, lo que sugiere que la población de microorganismos producida por un cultivo es heterogénea (Ritz y col., 2000). Mossel y col. (1995) explicaron el fenómeno indicando que un determinado número de células vivas quedaba protegido por células que ya habían muerto o por los productos de su destrucción pero esta hipótesis no es probable porque va contra la ley de Pascal que predice que la presión hidrostática es isostática, además del efecto que produce el agua necesaria como fluido transmisor. Otra hipótesis que se ha ofrecido para explicar la desviación de la linealidad ha sido que el suceso ocurre en dos fases pasando a través de una etapa intermedia (Heinz y Knorr, 1996; Knorr, 2000). Casi todos los autores han observado estas "colas" con cualesquiera de las especies microbianas que han utilizado en sus estudios. Por lo tanto, hay que considerarlas como un fenómeno habitual en la cinética de destrucción microbiana por las altas presiones. Hay que apuntar al respecto que actualmente también se recogen en estudios rigurosos sobre tratamientos térmicos.

La existencia de una población residual de una mayor resistencia a las altas presiones, que es lo que realmente indican las citadas "colas", tiene implicaciones prácticas de gran trascendencia porque los habituales parámetros D y z que con tanto éxito se han utilizado para predecir la población que sobrevive a los procesos térmicos (pasteurización y esterilización) no se pueden aplicar en el caso de las altas presiones. Algunos autores (McMeekin y col., 1993) han estudiado mediante métodos de los mínimos cuadrados la posibilidad de ajuste a otros modelos, concluyendo que el mejor se correspondía con una compleja ecuación logística que, en realidad, no ha trascendido porque era específica para la destrucción de *Staphylococcus carnosus* a 500 MPa en caldo nutritivo (Earnshaw, 1995). Sería necesario comprobar si la destrucción de otros microorganismos obedece a un modelo similar.

Aunque los mecanismos íntimos de la acción letal de las altas presiones no se conocen con exactitud, se considera de forma general que es el resultado de diferentes fenómenos simultáneos que conllevan lesiones en la membrana plasmática ocasionando la desorganización de la misma (Hoover y col., 1989; Mackey y col., 1994) que cursa normalmente con la muerte aunque se pueden producir también lesiones subletales que, dependiendo de las condiciones ambientales del microorganismo, pueden restablecerse. Sin embargo, el daño ocasionado en la membrana puede variar entre relativamente bajas y altas presiones y su relación con la muerte celular puede diferir entre especies y fases de crecimiento (Pagán y Mackey, 2000). Asimismo, existen algunas evidencias (Sonoike y col., 1992; Hashizume y col., 1996) que indican que algunas enzimas microbianas pueden ser la "diana" de la desactivación por las altas presiones. Las enzimas de las membranas que participan en el sistema de transporte son unas firmes candidatas a verse afectadas por las altas presiones, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de la levadura de panadería que fue inactivada por presiones de 100 - 200 MPa (Jaenicke, 1991). Lo mismo se podría decir de las enzimas encargadas del reflujo de protones, como la ATPasa F_0F_1 (Wouters y col., 1998).

El grado de destrucción microbiana por las altas presiones depende, en primer lugar, del tipo de microorganismo que se trate (Earnshaw, 1995). En relación con la manorresistencia de los microorganismos, pueden ordenarse, de menos a más resistentes, como mohos y levaduras → bacterias Gram negativas → virus con envoltura → hongos → bacterias Gram positivas → virus desnudos → esporas

bacterianas. Se ha postulado que como la estructura de la membrana plasmática es más compleja en las Gram negativas, la célula bacteriana sería más sensible a los agentes externos, entre ellos la presurización (Shigehisa y col., 1991). Los mohos y levaduras se desactivan a presiones de 200 – 300 MPa (Cheftel, 1995); las Gram negativas se destruyen generalmente entre 300 – 400 MPa aunque hay alguna bacteria Gram negativa con gran interés en la industria alimentaria que presenta una manorresistencia anormalmente muy elevada, tal es el caso de *Escherichia coli* O157-H7, por ejemplo, en leche UHT (Patterson y col., 1995a). No obstante, hay que advertir acerca de la manorresistencia de Gram positivas y negativas que últimamente se ha detectado un solapamiento considerable entre ambos grupos de formas vegetativas (McClements y col., 2001). Entre las Gram positivas merece especial mención las especies del género *Staphylococcus*, que pueden sobrevivir tras la aplicación de presiones de 500 MPa durante 60 minutos (Earnshaw, 1995). Entre estas especies se encuentra *Staph. aureus*, una bacteria patógena que tras un tratamiento de 600 MPa durante 10 - 30 minutos en muestras de carne o leche inoculadas sólo se reduce su número entre 2 y 6 ciclos logarítmicos (Shigeisa y col., 1991; Patterson y col., 1995a; Gervilla y col. 1997). Las bacterias esporuladas son bastante más manorresistentes, se requieren presiones del orden de 1000 MPa, o más, para lograr su destrucción (Earnshaw y col., 1995; Smelt, 1998) aunque puede haber bastantes diferencias entre cepas (Nakayama y col., 1996). *Clostridium botulinum* (Rovere y col., 1998; Reddy y col., 1999) se ha mostrado extremadamente manorresistente (no se observó ninguna reducción del número de esporas) con tratamientos de 5 minutos a 827 MPa a temperaturas inferiores a 35°C y se necesitaron presurizaciones a 50 – 55°C para lograr, a aquella presión, 5 reducciones logarítmicas (Reddy y col., 1999). Incluso se ha informado que, a temperatura ambiente, se han necesitado presiones de 1500 MPa para lograr tan sólo 1,5 reducciones decimales de esporas de *Clostridium sporogenes* en caldo de zanahoria (Rovere, 1996). Esta gran manorresistencia se ha relacionado con el estado deshidratado, o incluso potencialmente vítreo, del protoplasto de las esporas que le confiere resistencia a sustancias químicas, agentes físicos como el calor y las radiaciones ionizantes. Este estado, evidentemente, se mantiene durante la aplicación de altas presiones y parece ser que le confiere la extrema manorresistencia (Gould, 1995). La gran manorresistencia de las bacterias esporuladas parece que es de carácter general en todas las especies. Sin embargo, se ha informado casos en que se han desactivado a presiones mucho más bajas, del orden de 50 – 300 MPa (Sale y col., 1970), lo que se ha atribuido a una activación de la germinación por las altas presiones seguido de la muerte de las células vegetativas (Smelt y col., 1998), en algunos casos también combinadas con nisina (Capellas y col., 2000). La misma explicación se ha utilizado para justificar la enorme destrucción (más de 8 unidades logarítmicas) de esporas de *Bacillus subtilis* cuando se sometieron a tratamientos alternativos de 1 minuto a 60 y 500 MPa (Sojka y Ludwing, 1997).

Los virus son agentes infecciosos compuestos bien exclusivamente de ácidos nucleicos y proteínas (virus desnudos), y en algunos casos con la presencia adicional de lípidos (virus con envoltura). La inmensa mayoría de virus causantes de infecciones alimentarias son virus desnudos, y entre éstos cabe destacar al virus de la hepatitis A, responsable a nivel mundial de la mitad de todas las hepatitis diagnosticadas, rotavirus, causantes cada año de alrededor de un millón de muertes infantiles en todo el mundo, y los norovirus que están implicados en el 90% de las gastroenteritis causadas por alimentos.

Se han estudiado los efectos de presiones hidrostáticas elevadas en varias cepas de virus (Oliveira y col., 1999). La alta presión desnaturaliza las proteínas de las cápsides víricas. Dependiendo de la presión ejercida, esta desnaturalización puede ser reversible o irreversible (Silva and Weber). Se ha empleado alta presión para inactivar el virus de la inmunodeficiencia humana (Jurkiewicz y col., 1995), el virus de la estomatitis vesicular (Silva y col., 1992) o rotavirus bovinos y de simio (Pontes y col., 1997). Se ha podido comprobar que las altas presiones son capaces de inactivar los virus sin alterar sus propiedades antigénicas, lo cual abre también prometedoras vías de preparación de vacunas víricas inactivadas (Balny y col., 1992; Basset y col., 1956). En la industria alimentaria también se ha propuesto (Kingsley y col., 2002) el uso de altas presiones (de alrededor de 450 MPa) para proporcionar un mayor nivel de seguridad al marisco, frecuentemente involucrado en brotes de gastroenteritis o hepatitis de origen vírico.

Aparte de las diferencias entre especies y cepas de microorganismos que se han mencionado, uno de los factores que adquiere importancia es la fase de crecimiento. En general, las células en fase de crecimiento exponencial son más sensibles a las altas presiones que en fase estacionaria (Patterson y col., 1995a; Isaacs y col., 1995; Benito y col., 1999; Karatzas y col., 2002). Por ejemplo, se ha observado en *E. coli* que un tratamiento de 200 MPa durante seis minutos no consigue reducir el número de células bacterianas en un ciclo logarítmico si aquéllas están en fase estacionaria pero se logra una reducción superior a seis ciclos si se encuentran en fase exponencial (Isaacs y col., 1995) aunque en esta misma especie se ha observado que en fase estacionaria hay cepas mucho más resistentes que otras, pero en fase exponencial todas ellas muestran la misma sensibilidad a las altas presiones (Pagan y Mackey, 2000). Existen datos que apuntan a que las células bacterianas son más sensibles a la presión cuando la membrana es rígida y más resistente cuando es fluida (Smelt y col., 1994), lo que quizás puede estar relacionado con la acumulación de componentes celulares, como proteínas, en la fase estacionaria que podría minimizar los efectos de las altas presiones (Isaacs y col., 1995). Esta hipótesis puede apoyarse en el efecto protector que se ha observado cuando el medio de presurización que se ha empleado ha sido algún alimento (Styles y col., 1991) o se le ha adicionado algún componente normalmente presente en alimentos, como albúmina o glucosa (Simpson y Gilmour, 1997b).

Son numerosos los agentes y factores que afectan la destrucción de los microorganismos por altas presiones; entre ellos, se encuentran: temperatura, tiempo y presión aplicada, la fase de crecimiento, temperatura de formación de esporas, la cepa, presencia o ausencia de sustancias antimicrobianas y la matriz alimentaria implicada. Uno de los factores más importantes es el medio en que se realiza el tratamiento. La tabla 1 (apéndice I) muestra claramente que, con cualquier especie, cuando las altas presiones se aplican directamente en el alimento, las bacterias presentes son mucho más manorresistentes, incluso en sistemas modelos donde se ha adicionado compuestos que habitualmente forman parte de diversos alimentos, como albúmina, carbohidratos, lípidos (Patterson y col., 1995a,b; Simpson y Gilmour, 1997b; Doyle, 1999). No obstante, se ha observado también que, a veces, el alimento en vez de ejercer un efecto protector, hace que la aplicación de las altas presiones sea más efectiva (Linton y col., 1999) o, al menos, tan efectivas como los tampones (Gervilla y col. 2000; O'Reily 2000). La protección ejercida por los componentes de los alimentos permite concluir que a la hora de establecer unas condiciones/criterio de tratamiento mediante altas presiones para asegurar

un producto final inocuo, deben ignorarse los datos publicados acerca de la manorresistencia en tampones o medio de laboratorio, ya que no son directamente extrapolables a las situaciones reales, es decir, al alimento.

En cualquier proceso, es importante la intensidad del mismo pero también hay otros factores que influyen poderosamente en la eficacia del tratamiento; éstos son la temperatura y la acidez del medio y el tiempo de tratamiento. Recientemente, se ha publicado un estudio (Ritz y col., 2000) con *L. monocytogenes* en el que se contempla el efecto de diversos niveles de presión (200 - 600 MPa), tiempo (3, 10 y 20 minutos), temperatura (4, 20 y 40°C) y pH (5,6 y 7,0) del medio de tratamiento. El programa experimental constaba de 40 pruebas diseñadas de acuerdo con el algoritmo de Fedorov (1972). Con este modelo se pudo determinar el efecto individual de cada variable y sus interacciones en el grado de desactivación de *L. monocytogenes*. Todas las variables y sus interacciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$) en relación con la inactivación de la bacteria por las altas presiones. Los dos factores que tuvieron mayor ponderación fueron, por este orden, la presión y el pH, seguidos por la temperatura del medio y el tiempo de tratamiento. En relación con la presión se observaron diferencias de 6,9 ciclos logarítmicos ente el nivel más elevado (600 MPa) y el más bajo (200 MPa), con una relación sigmoideal entre aumentos de presión y eficacia letal. En cuanto al pH se apreció una mayor desactivación de células a bajo pH (5,6), con una diferencia de 2,34 ciclos logarítmicos a pH 7,0. A 20 °C, el efecto letal de las altas presiones fue menor (1,24 unidades logarítmicas) que a 40°C, no observándose diferencias significativas entre 20 y 4 °C. Finalmente, el tiempo de tratamiento fue la variable que menos influyó en la letalidad, encontrándose una diferencia significativa ($p < 0,01$) de 1,02 ciclos entre 3 y 20 minutos de tratamiento pero sin diferencias estadísticas entre 3 y 10 minutos. Alpas y col. (2000), aplicando altas presiones a 25 °C, llegaron a conclusiones similares, utilizando como modelo de estudio diversas especies de bacterias patógenas (*L. monocytogenes*, *Staph. aureus*, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* y *S. typhimurium*) aunque cuando la temperatura de presurización fue de 50 °C desaparecían las diferencias. Adicionalmente, estos autores informaron que en presencia de ácido láctico o ácido cítrico se aumenta la sensibilidad a las altas presiones de dichas bacterias en 1,2 – 3,9 ciclos logarítmicos. Gervilla y col. (2000) encontraron que temperaturas entre -20 y 25°C no parecen afectar a la letalidad de *Staph. aureus* CECT 534 en leche ovina, mientras que a partir de 30°C la aumenta a medida que lo hace la temperatura.

Los resultados de Ritz y col. (2000) ratifican globalmente los conseguidos por otros autores. La mayor eficacia letal a medida que aumenta el nivel de presión es de carácter general (Patterson y col., 1995a; Cheftel, 1995; Hayashi y Balny, 1997; Smelt, 1998) aunque a veces se observan diferencias destacables e incluso se ha informado (Pagan y Mackey, 2000) que una cepa (la H1071) en fase estacionaria de *E. coli* O157:H7 es más resistente a presiones elevadas (400 o 500 MPa) que a bajas (300 MPa). De hecho las verdaderas cinéticas de primer orden se alcanzan a presiones comprendidas entre 600 y 700 MPa.

En un trabajo (Alpas y col., 1999) realizado con 9 cepas de *L. monocytogenes*, 7 de *Staph. aureus*, 6 de *E. coli* O157:H7 y 6 de *Salmonella* spp se observó que un tratamiento a células en fase estacionaria de 5 minutos a 345 MPa ocasionaba reducciones (ciclos logarítmicos) en las bacterias anteriores de 0,9 - 3,5, de 0,7 - 7,8, de 2,8 - 5,6 y de 5,5 - 8,3, respectivamente. El resultado mostró que

había una gran variabilidad entre las cepas a 25 °C pero cuando la presurización se hizo a 50 °C, todas las cepas fueron más sensibles reduciéndose su número, en todos los casos, en más de 8 ciclos logarítmicos, excepto una cepa de *Staph. aureus* que incluso durante 15 minutos en las condiciones anteriores sólo se redujo su número en 6,3 ciclos. A pesar de estos datos, se ha observado a veces una mayor sensibilidad a las altas presiones a temperaturas de refrigeración que a temperaturas ambiente (Yuste y col., 1999).

En el caso de las bacterias es también una constante que el pH ácido aumenta la sensibilidad de las mismas frente a las altas presiones (Smelt, 2000; Alpas y col., 2000; Tholozan y col., 2000) pero su acción va más allá, ya que retrasa el inicio del crecimiento de las células que han sido dañadas subletalmente (Smelt, 1998). Sin embargo, hay que apuntar que los mohos y levaduras pueden multiplicarse a valores del pH más bajos que las bacterias, lo que puede estar relacionado con la mayor manorresistencia que presentan a pH inferiores a 4,0 (Smelt, 1998), habiéndose informado, por ejemplo, que *Rhodotorula rubra* presenta la misma manorresistencia en el intervalo de pH de 3,0 a 8,0 (Oxen y Knorr, 1993). Aparte de estas acciones, no se han encontrado efectos específicos de los diferentes ácidos orgánicos, lo que puede deberse a que la presurización favorece la ionización y los ácidos orgánicos son particularmente agentes inhibidores del crecimiento bacteriano en su forma no disociada (Smelt, 1998).

Otro de los factores que adquiere gran importancia es la actividad de agua (a_w) porque, por sí misma, inhibe eficazmente el crecimiento de, por el orden que se cita, bacterias, mohos y levaduras al reducirse desde valores de 0,98 - 0,99 (los que poseen la mayoría de los alimentos frescos) hasta, progresivamente, 0,62 por debajo del cual no es posible el crecimiento microbiano. Al igual que en el caso del calor, la a_w es un agente que se comporta de forma antagónica (Rodríguez y col., 2000) dado que a menor a_w mayor es la manorresistencia de los microorganismos. Así se ha comprobado en levaduras y bacterias. En *Rhodotorula rubra* (Oxen y Knorr, 1993) se ha observado que a valores de a_w por debajo de 0,94 se manifestaba un efecto protector, independientemente del soluto (sacarosa, glucosa, fructosa o NaCl) que se utilizase para reducir la a_w . Similares resultados han sido observados recientemente con *E. coli* en tampón fosfato adicionado de diferentes concentraciones de sacarosa entre 0% y 50% (Opstal y col., 2003). Asimismo, Rodríguez y col. (2000) informaron con *E. coli* que, tras un tratamiento de 414 MPa a 21°C durante 5 minutos, el número de bacterias desactivadas decrecía a medida que lo hacía la a_w desde 0,99 a 0,91. No obstante, el efecto neto de la disminución de la a_w no es fácil de predecir (Smelt, 1998) y se necesitan más investigaciones al respecto, en especial con *L. monocytogenes* que puede soportar relativamente bajas a_w (Wemekamp-Kamphuis y col., 2002).

Además de los factores antes comentados, se ha ensayado el efecto de otros muchos agentes/factores en la resistencia frente a las altas presiones de los microorganismos. Entre ellos, conservadores, como ácido sórbico que es más activo en combinación con la presurización (Mackey y col., 1995) o nisina que sensibiliza a las bacterias Gram negativas frente a las altas presiones (Kalchayanand y col., 1994; Masschalck y col., 2001a; Garriga y col., 2002), lo que se podría explicar por el mecanismo de acción de la nisina que interactúa con la membrana y es posible que penetre con más facilidad (Smelt, 1998). Las bacteriocinas también muestran una acción sinérgica, como la pediocina, como se ha comprobado con

L. monocytogenes que sufre 8 reducciones decimales en presencia de esta bacteriocina cuando se ha aplicado un tratamiento de 5 minutos a 345 MPa (Kalchayanand y col., 1998). El sistema lactoperoxidasa tiocianato también se ha mostrado eficaz junto a las altas presiones en bacterias patógenas, incluidas *Staph. aureus*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* (García-Graells y col., 2000) y alterantes, como *Pseudomonas fluorescens* (García-Graells y col., 2003). *E. coli* parece resistente (García-Graells y col., 2000; García-Graells y col., 2003) aunque el sistema lactoperoxidasa sí fue eficaz en esta especie en presencia de sacarosa (Opstal y col., 2003). Se ha estudiado también la acción combinada antimicrobiana de las altas presiones con carvacrol (Karatzas y col., 2001), lactoferrina y lactoferricina (Masschalck y col., 2001a) y lisozima (Masschalck y col., 2001b) frente a diversas bacterias Gram negativas patógenas y alterantes, observándose sinergismo entre esos agentes y las altas presiones.

Cuestión y términos en que se cuestiona

La cuestión que se plantea es analizar, a la luz de los conocimientos actuales, si el tratamiento de la carne y productos cárnicos con altas presiones es apropiado para conseguir el objetivo de seguridad alimentaria en dichos productos y lograr así un nivel adecuado de protección al consumidor.

Asimismo, se pretende establecer qué bacterias adquieren importancia en relación con la manorresistencia de las mismas y qué presurizaciones se requieren para conseguir el FSO relativo a estas bacterias en los productos cárnicos.

Evaluación del riesgo

1. Identificación del peligro

En primer lugar, conviene apuntar que ante la gran manorresistencia que presentan las esporas bacterianas, se puede decir que las altas presiones, en el estado actual de desarrollo, no parece que puedan utilizarse para la esterilización de alimentos, ya que, desde un punto de vista tecnológico, siempre sobreviviría una subpoblación que ocasionaría la alteración del producto final y, desde un punto de vista sanitario, en aquellos alimentos de actividad de agua elevada (a_w) y pH poco ácido ($> 4,5$) sería necesario, al menos, aplicar el concepto 12 D que se emplea en la industria conservera respecto a las esporas proteolíticas de *Clostridium botulinum*; serían necesarias presiones muy elevadas para conseguir esa meta si se tiene en cuenta la manorresistencia de las esporas de *Cl. botulinum* que se ha descrito, de sólo 5 reducciones logarítmicas durante 5 minutos a 827 MPa con una temperatura del medio de 50 – 55°C (Reddy y col., 1999). Las altas presiones sí pueden ser útiles, sin embargo, para conseguir la estabilidad microbiológica en aquellos alimentos que, debido a otros agentes inhibidores, las bacterias esporuladas no pueden germinar y multiplicarse, como ocurre en los productos que han aparecido en el mercado. Entre ellos, mermeladas, con una baja a_w , y ciertos zumos, con un bajo pH.

Se puede extraer una primera conclusión en el caso de la carne y productos cárnicos. Esta sería: hasta el momento, la aplicación de altas presiones queda restringida en la industria cárnica a la higienización (equivalente a pasteurización) de alimentos, lo que implica que los microorganismos a tener en cuenta principalmente son los patógenos no esporulados. No cabe duda que, al mismo tiempo, se reduciría la carga de bacterias alterantes, en especial las aerobias Gram negativas, con lo que se lograría, al tiempo, un aumento de la vida útil del producto refrigerado.

Al igual que con otras tecnologías, la higienización de un alimento mediante la aplicación de altas presiones requiere establecer unas condiciones mínimas de tratamiento que asegure que el número de microorganismos patógenos en el momento de su consumo tenga un nivel adecuado para la protección del consumidor (ALOP). El ejemplo comparativo más demostrativo que se puede exponer es el de la leche pasteurizada. El tratamiento que en su día se diseñó derivó de la termorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis* que era la bacteria patógena no esporulada más resistente a la acción letal del calor de las que podían encontrarse en la leche cruda. Si se lograba la destrucción de dicha bacteria se aseguraba la muerte de las restantes. El tratamiento térmico diseñado (75°C, 15 segundos, o su equivalente, ocasiona más de 10 reducciones decimales del número de *M. tuberculosis*), seguido de la refrigeración durante el almacenamiento posterior, se ha venido aplicando durante todo el siglo XX, obteniéndose un producto final con un buen registro sanitario.

En el caso presente, la situación es similar; es necesario conocer de entre las bacterias patógenas que pueden encontrarse en la carne y productos cárnicos, cuales son las más manorresistentes, cómo influyen en la manorresistencia los distintos agentes y factores ambientales y, en definitiva, qué condiciones prácticas son las más adecuadas para conseguir reducir su número hasta niveles estadísticamente despreciables, es decir, los que se deriven del ALOP que se establezca.

De la tabla 1 (apéndice I) se desprende que tres son las bacterias que presentan mayor resistencia frente a las altas presiones: *Staph. aureus* > *E. coli* O157:H7 > *L. monocytogenes*. La primera no es peligrosa *per se* sino que su carácter patógeno deriva de las enterotoxinas que produce durante su multiplicación. Las otras dos son bacterias que al multiplicarse en el organismo producen la enfermedad. Estas bacterias se puede controlar en los alimentos, desactivándolas (tratamientos térmicos, radiaciones, altas presiones, etc.) o previniendo su crecimiento (aplicación de frío, baja actividad de agua, sustancias inhibidoras, etc.). *L. monocytogenes* se diferencia de las otras dos en una peculiaridad de gran importancia práctica; es la facultad que tiene de multiplicarse a temperaturas de refrigeración, es decir, es una bacteria psicrotrofa que, conlleva, como se verá más adelante, la necesidad de controlar su presencia.

A pesar de la potenciación del efecto letal de las altas presiones por los diversos agentes/factores que se han discutido en el apartado anterior, es probable que en algunos productos cárnicos no se pueda hacer uso de los mismos porque su adición, por la singularidad del producto (p.e. jamón cocido) o por la expresa prohibición legal (p.e. carne picada), no puede llevarse a cabo o simplemente un fabricante no desea hacerlo para ofrecer al consumidor un producto genuino. En consecuencia, la selección de los microorganismos "diana" ha de hacerse de acuerdo con la manorresistencia inherente de los mismos.

Son, pues, tres especies las que han de tenerse en cuenta. En primer lugar *Staph. aureus* que es la más resistente frente a la acción letal de las altas presiones y, en segundo lugar, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*.

2. Caracterización del peligro.

2.1. *Staphylococcus aureus*

Staph. aureus es una bacteria ubicua, siendo el principal reservorio el hombre de tal forma que la persona colonizada es portadora de estafilococos, lo que supone una diseminación de los mismos a otros

individuos o alimentos. Una de las dificultades para controlar *Staph. aureus* es el gran número de reservorios humanos y animales que hay. Asimismo, se encuentra en el polvo, aire, desechos, agua, etc. de donde fácilmente puede pasar a los alimentos. Sin embargo, las características de crecimiento y supervivencia de *Staph. aureus* (véase apéndice II) permiten deducir que el control de *Staph. aureus* es fácil en alimentos refrigerados, ya que a temperaturas por debajo de 8–10 °C no se multiplica. Por tanto, en la carne fresca y productos cárnicos pasteurizados que requieren un almacenamiento bajo refrigeración no ha de preocupar la presencia de *Staph. aureus*. Por otra parte, si se produjera un abuso de temperatura de unos pocos grados (p.e. hasta 12–14°C) durante la distribución del producto y su almacenamiento en el hogar, su multiplicación sería muy lenta y el número de células difícilmente alcanzaría el nivel de 10^5 – 10^6 g⁻¹ necesario para acumularse una cantidad de toxina suficiente para que se presentase los síntomas de la intoxicación. En consecuencia, se debe descartar esta especie como microorganismo “diana” para la evaluación de la eficacia de las altas presiones en productos cárnicos.

2.2. *E. coli* O157:H7

Para comprender el peligro que supone la ingestión de *E. coli* O157:H7 con los alimentos, baste decir que es la bacteria causante de una grave enfermedad que cursa con colitis hemorrágica, dolores abdominales, vómitos, síndrome urémico hemolítico (HUS), con una mortalidad relativamente elevada, sobre todo en niños menores de 5 años y ancianos (AGA, 1994; Tarr, 1994), habiéndose observado en los últimos una mortalidad de hasta el 50% aunque en individuos normales se sitúa, como media, entre el 2 y el 7% de los pacientes que presenta el síndrome HUS (WHO, 1997). Además, la dosis infectiva es muy baja, aceptándose un valor inferior a 100 células por gramo de alimento (ICMSF, 2002) y aún es menor (probablemente unas 10 células g⁻¹) en individuos especialmente susceptibles, como ancianos, niños, inmunocomprometidos, etc. (Meng y col., 2001; ICMSF, 2002).

El reservorio más importante de *E. coli* O157:H7 es el ganado vacuno (piel e intestino) donde su prevalencia es elevada, habiéndose aislado en el 36% de vacas y 57% de terneras de 80 cabezas analizadas en Canadá (Wilson y col., 1996) y en el 3,2% de 191 terneras estudiadas en EEUU (Zhao y col., 1995). No obstante, se han detectado también en otros animales de abasto, domésticos y silvestres, como ovejas, cabras, cerdos, caballo, perros, gatos, ratas, ciervo, gaviota, etc. (Chapman, 2000) e incluso en cebú (Kaddu-Mulindwa y col., 2001). En los animales de abasto llega a la canal a partir de la piel e intestino durante el sacrificio de donde puede pasar a piezas cárnicas de menor tamaño y llegar últimamente a la carne picada, que sirve como ingrediente de diversos productos RTE (hamburguesas, salchichas, albóndigas, etc.). También adquiere importancia la contaminación cruzada en cocinas y establecimientos colectivos desde la carne de vacuno a otros alimentos RTE. *E. coli* O157:H7 puede llegar al hombre también por contacto directo con animales (WHO, 1997). En el hombre, las personas que han padecido la enfermedad eliminan células de *E. coli* O157:H7 con las heces durante semanas (Karch y col., 1995) pero no se ha identificado un portador asintomático de largo término. Por ello, se ha deducido que la contaminación entre humanos es de persona a persona.

Es difícil comparar los datos procedentes de diferentes países acerca de la incidencia y prevalencia de *E. coli* O157:H7 en la carne debido a los distintos métodos de estudio que se han empleado.

No obstante, se puede decir que es un patógeno que preocupa a nivel internacional con estimaciones de su prevalencia en la carne del 1,5% - 5% (ICMSF, 2002).

La información anterior, unida a la incluida en el apéndice II, permite deducir el peligro que supone la presencia de *E. coli* O157:H7 en la carne y productos cárnicos, sobre todo en los RTE, es decir, en lo que se consumen sin ningún tratamiento culinario previo. Es, pues, un microorganismo "diana" para establecer las condiciones de tratamientos por altas presiones de la carne y productos cárnicos para la obtención de un producto final con un nivel apropiado de protección al consumidor.

2.3. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es el agente causal de una enfermedad que se adquiere por su ingestión con los alimentos aunque también puede transmitirse de la madre al feto. La enfermedad puede ser leve o severa y no cursa, como otras enfermedades intestinales, con fiebre, dolores abdominales, diarrea, etc. sino que se manifiesta, en su versión leve, con fiebre, dolores musculares y a veces náusea. La modalidad severa (invasiva) se caracteriza por fiebre repentina, dolor de cabeza intenso, rigidez del cuello y mareos, pudiendo invadir el sistema nervioso con la aparición de pérdidas del equilibrio y convulsiones, meningitis y encefalitis y, finalmente, septicemia. Aunque cualquier persona puede adquirir la enfermedad, es muy poco común en niños, jóvenes y adultos con el sistema inmunitario sano pero hay un sector de la población, que se ha calculado en alrededor del 15% (Buchanan y col., 1997), especialmente sensible. Entre estos individuos pueden citarse a embarazadas (pueden abortar o presentar un parto prematuro), recién nacidos (pueden presentar retraso mental e hidrocefalia), inmunocomprometidos (afectados de cáncer, SIDA, trasplantes, diabetes u otras enfermedades). Son estos individuos los propensos a adquirir la modalidad severa de la enfermedad que en EEUU se estima se ven implicadas anualmente alrededor 2.500 personas, de las cuales 500 mueren (CDCP, 2003).

L. monocytogenes está ampliamente distribuida en todos los ambientes (alimentos, vegetación en descomposición, ensilados, agua, suelos, residuos fecales, heces de humanos y animales sanos, etc.) y se ha estimado que entre el 2 y el 6% de los humanos son portadores mudos aunque el papel que éstos desempeñan en la diseminación de la enfermedad no se sabe aún (Rocourt, 1996). Los brotes de listeriosis que se han presentado y las investigaciones epidemiológicas han permitido deducir que los alimentos RTE son de alto riesgo para individuos susceptibles. Los alimentos RTE que se contaminan después de haber recibido un tratamiento térmico y se mantienen bajo refrigeración proporcionan un excepcional ambiente para el crecimiento de *L. monocytogenes*, debido a la reducción de la microbiota competitiva; esta situación es más favorable aún si la a_w se sitúa en los niveles de 0,90 - 0,94 a la que muchos de los microorganismos alterantes de carácter psicrotrofo no pueden multiplicarse o lo hacen lentamente. Por otra parte, *L. monocytogenes* se adhiere fuertemente a la superficie de las carnes y es difícil eliminarla o inactivarla. *L. monocytogenes* se multiplica fácilmente en los productos cárnicos refrigerados, incluso los envasados a vacío, a pH próximos a 6,0 pero su crecimiento es muy lento a pH de 5,0 (Farber y Peterkin, 1999; Glass y Doyle, 1989). Las listerias son muy difíciles de eliminar, e incluso de reducir su incidencia, en los establecimientos que elaboran este tipo de productos, debido a que las bacterias se alojan en zonas muy recónditas de los equipos, como juntas, vál-

vulas, etc. donde puede persistir durante años y en cualquier momento puede contaminar el alimento, incluso si el producto ha estado libre de listerias durante meses (ICMSF, 2002).

No se sabe cual es la dosis infectiva. Sin embargo, los datos publicados (véase apéndice II) indican que se sitúa entre 10^2 y 10^6 u.f.c. g^{-1} (ICMSF, 2002). Aunque *L. monocytogenes* está ampliamente distribuida en todos los entornos y puede aislarse de numerosos alimentos, la listeriosis en humanos es relativamente rara, de 2 – 3 (Mead y col., 1999) a 5 – 6 (CDCP, 2000) casos anuales por millón de individuos. Estas circunstancias apoyan la opinión de que las infecciones se producen por dosis elevadas de células de *L. monocytogenes* (Notermans y col., 1998; SCVPH, 1999).

La presencia, pues, de *L. monocytogenes* en la carne y productos cárnicos constituye un grave peligro para los humanos. Sus características (véase apéndice II), especialmente su manorresistencia y su psicrofilia, hacen que esta bacteria sea, junto a *E. coli* O157:H7, un microorganismo “diana” para establecer las condiciones de tratamientos por altas presiones de la carne y productos cárnicos para obtener un producto final con un nivel apropiado de protección al consumidor.

3. Establecimiento del objetivo de seguridad alimentaria (FSO)

Para establecer qué tratamiento por altas presiones mínimo debe aplicarse a los productos cárnicos para que el producto esté exento de *E. coli* O157:H7 y de *L. monocytogenes* hasta un aceptado nivel de protección del consumidor, lo más oportuno, quizás sea utilizar los argumentos y criterios que algunas instituciones (FDA, 1999, 2001; ICMSF, 2002) han empleado para estimar en hamburguesas y salchichas tipo frankfurt, respectivamente, el FSO (máxima frecuencia o concentración de un peligro microbiano en un alimento en el momento de su consumo que ofrece un adecuado nivel de protección) y establecer así el tratamiento térmico que debe aplicarse para conseguir el correspondiente FSO que, en el presente caso, se correspondería por el tratamiento con altas presiones.

3.1. Estimación del FSO para *E. coli* O157:H7

De acuerdo con la baja dosis infectiva de *E. coli* O157:H7 (< 100 células e incluso una decena para individuos susceptibles), la gravedad de la enfermedad que ocasiona, los datos disponibles de los brotes que han ocurrido y adoptando una actitud conservadora, la ICMSF (2002) sugiere un FSO para hamburguesas de una tasa final de *E. coli* O157:H7 de 1 u.f.c. $250 g^{-1}$ ($-2,4 \log_{10}$ u.f.c. g^{-1}), lo que equivale a no más de 1 célula por cada dos hamburguesas de 125 g cada una.

Por otra parte, teniendo en cuenta los datos de incidencia de *E. coli* O157:H7 en la carne, la ICMSF (2002) ha estimado que, en el peor de los casos, el número de células de *E. coli* O157:H7 que puede existir por gramo de carne fresco es de 100. Por lo tanto, para lograr el FSO señalado anteriormente en el momento del consumo de la hamburguesa es necesario conseguir 4,4 reducciones decimales. Los parámetros que se han descrito sobre la termorresistencia de *E. coli* O157:H7 son, por ejemplo a 62,8 °C, un valor D de 24 segundos (véase apéndice II), lo que significa que con un tratamiento térmico a esa temperatura en el punto más frío de la pieza bastaría con unos 2 minutos para lograr el FSO.

Este mismo criterio se podría emplear para *E. coli* O157:H7 en el tratamiento de productos cárnicos crudos susceptibles de ser tratados mediante altas presiones, es decir, un FSO de $-2,4 \log_{10}$ u.f.c.

g^{-1} partiendo de una tasa original de 10^2 u.f.c. g^{-1} que conllevaría al menos 4,4 reducciones decimales. En otros productos, como los RTE, como los que han sido previamente cocidos industrialmente y se lonchean para su venta al detalle (jamón cocido, mortadela, chopped, etc.), el FSO ha de ser el mismo pero, en cambio, la tasa original de *E. coli* O157:H7 será más baja. La ICMSF (2002) no analiza este caso porque *E. coli* O157:H7 difícilmente se multiplica durante el almacenamiento bajo refrigeración pero sí lo hace en el caso de *L. monocytogenes* en el que asume una recontaminación de 10 células g^{-1} . Como, por una parte, *E. coli* O157:H7 es una bacteria con menor ubicuidad que *L. monocytogenes* y, por otra, la posibilidad de *E. coli* O157:H7 de alcanzar aleatoriamente el producto tras su procesado es menor, se podría, imitando la hipótesis de la ICMSF para *L. monocytogenes*, rebajar el número de células que recontaminan el alimento, hasta incluso 1 célula g^{-1} . Entonces, 2,4 reducciones decimales sería suficiente para lograr el objetivo microbiológico y, en consecuencia, se podría disminuir, en los alimentos RTE, la intensidad del tratamiento por altas presiones.

En conclusión, en el caso de *E. coli* O157:H7, el FSO para productos cárnicos crudos y para productos RTE podría establecerse en un tratamiento que logre, respectivamente, 4,4 y 2,4 reducciones decimales del número de células.

3.2. Estimación del FSO para *Listeria monocytogenes*

Aunque la ICMSF (2002) utiliza como modelo las salchichas tipo frankfurt, los criterios y conceptos que se hacen para evaluar el riesgo de *L. monocytogenes* en este alimento son extrapolables a otros tipo de salchichas como las de tipo bologna, diversas variedades de productos cocidos preparados con pasta fina, como mortadela, galantina, etc. e incluso a paleta y jamón cocidos y también a otros alimentos RTE. El tratamiento térmico ($> 75^\circ\text{C}$) que desde un punto de vista tecnológico se aplica en la industria (coagular la proteína, formación del gel, fijar el color con el nitrito, destruir bacterias alterantes y patógenas) para fabricar productos cocidos de esta naturaleza es suficiente para destruir *L. monocytogenes* y el resto de patógenos no esporulados. No ha de preocupar, pues, el producto en el que se ha practicado la cocción en el envase y se libra al mercado y se consume inmediatamente una vez abierto el mismo. Sin embargo, otros se envasan tras el calentamiento y muchos de ellos se lonchean para preparar raciones domésticas. En estos casos puede producirse la recontaminación por *L. monocytogenes*. Es un requisito de todos estos productos su almacenamiento bajo refrigeración.

El proyecto definitivo del reglamento de la Comisión Europea relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios especifica en relación con *L. monocytogenes*, dejando aparte los alimentos para lactantes (ausencia en 25 g), lo siguiente:

- a) En alimentos listos para el consumo que pueden permitir el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean los destinados a lactantes ni a usos médicos especiales, ausencia en 25 g ($n = 5$; $c = 0$; $m = 0$) al final del proceso de fabricación; < 100 u.f.c. g^{-1} ($n = 5$; $c = 0$; $m = < 100$) y 100 u.f.c. g^{-1} ($n = 5$; $c = 0$; $m = 100$) en productos comercializados antes del final y al final de la vida útil, respectivamente.
- b) En alimentos listos para el consumo que no permitan el desarrollo de *L. monocytogenes* ($\text{pH} < 4,4$ o $a_w < 0,92$), que no sean los destinados a lactantes ni a usos médicos especiales, 100 u.f.c. g^{-1} ($n = 5$; $c = 0$; $m = 100$) al final del proceso de fabricación y en productos comercializados.

La ICMSF (2002), basándose en datos y criterios similares a los mencionados para el caso de *E. coli* O157:H7 y teniendo en cuenta que *L. monocytogenes* puede multiplicarse en los alimentos RTE refrigerados, concluye también que el FSO para los productos RTE relativo a esta bacteria pudiera ser de 100 u.f.c. g⁻¹. En sus deducciones para el cálculo del FSO en frankfurters parte de una tasa original de 1.000 células g⁻¹ en la carne. Es una postura conservadora.

Admitiendo, pues, un FSO de 100 u.f.c. g⁻¹ de carácter general en el momento del consumo del producto y una tasa original de 1.000 células g⁻¹ en el alimento crudo se necesitaría para conseguir el FSO un tratamiento térmico durante el proceso de fabricación que ocasionara sólo una reducción decimal. Sin embargo, las células de *L. monocytogenes* supervivientes al tratamiento térmico pueden multiplicarse durante el almacenamiento bajo refrigeración, especialmente en alimentos de larga vida útil y en el momento del consumo haya sobrepasado el nivel de 100 u.f.c. g⁻¹. Es necesario asegurar que este fenómeno no se produce y, por ello, se requiere aplicar un criterio más severo. La ICMSF establece que una reducción de 6D sería suficiente, pues resultaría en 1 u.f.c. kg^{-1} (es decir, $10^{-3} \text{ u.f.c. g}^{-1}$) tras la cocción en caso que se aplique un tratamiento térmico aunque si se adoptaran medidas higiénicas adecuadas durante la manipulación del producto fresco y se aplicaran acciones (no permitir que ascienda la temperatura durante el almacenamiento refrigerado) para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* hasta su consumo, se podría aplicar un tratamiento algo más suave, por ejemplo, que provocara un reducción de 5D.

De acuerdo con los parámetros térmicos de *L. monocytogenes* descritos en carne picada (véase apéndice II) y con los tratamientos térmicos aplicados en la práctica, por ejemplo, un $F_{70^{\circ}\text{C}} = 5$ minutos para salchichas tipo frankfurt o $F_{65^{\circ}\text{C}} = 50$ minutos para jamón cocido en el punto más frío (Reichert, 1987), puede deducirse que se producirían unas 28 reducciones decimales, es decir, se logra siempre el FSO en los productos cocidos y, por tanto, no han de preocupar los productos que abandonan la industria ni siquiera con un periodo de almacenamiento bajo refrigeración largo, siempre que el proceso de cocción se haya efectuado una vez envasado el producto y se mantenga en el mismo hasta su consumo.

Sin embargo, la experiencia indica que es muy común la recontaminación del producto tras el proceso de cocción, durante su distribución al detalle. De hecho, se ha detectado *L. monocytogenes* en los productos finales, tal es el caso de las frankfurters (ICMSF, 2002) y en alguna ocasión se han aislado incluso de salchichas que se habían mantenido en el frigorífico de un paciente 4 meses después de su fabricación (Wenger y col., 1990). De igual forma, la contaminación puede acaecer durante el loncheado de piezas cocidas (jamón cocido, mortadela, paleta, etc.) o no (jamón curado, embutidos, etc.) para su venta al detalle dado que cualquier microorganismo ubicuo, como *L. monocytogenes*, puede alcanzar potencialmente el producto en cualquier momento y en el caso de esta bacteria puede incluso aumentar su número durante el almacenamiento bajo refrigeración si las condiciones (a_w , pH, etc.) del producto lo permiten.

Tomando una postura conservadora, la ICMSF (2002) estima que una recontaminación en operaciones posteriores a la cocción puede, en el peor de los casos, alcanzar la tasa de 10 células g⁻¹. Lo mismo podría ocurrir durante el loncheado o manipulación de los productos RTE. Si se supone, en los productos que lo permitan, que durante el almacenamiento y distribución podría aumentar la tasa en $5 \log_{10}$

g^{-1} (ICMSF, 2002) quiere decir que en el momento del consumo existirían 10^6 u.f.c. g^{-1} , un valor totalmente insatisfactorio. Para evitar este incremento y ajustarse al objetivo microbiológico se podría hacer uso de un tratamiento con altas presiones. Anteriormente se ha mencionado que el objetivo microbiológico para productos cocidos elaborados en una industria podría situarse en ≤ 1 célula kg^{-1} (es decir 10^{-3} g^{-1}). Supóngase, de acuerdo con la ICMSF (2002), que la recontaminación, en el peor de los casos, es la anteriormente manifestada, es decir, de 10 células g^{-1} . Se conseguiría el nivel final de ≤ 1 célula kg^{-1} mediante un tratamiento que ocasionará 4 reducciones decimales. Si se admite un crecimiento durante el almacenamiento y distribución igual al anteriormente indicado, es de decir, $5 \log_{10}$ g^{-1} , el producto, en el momento de su consumo, contendría 10^2 u.f.c. g^{-1} , o sea, se cumpliría el FSO.

En conclusión, en el caso de *L. monocytogenes*, el FSO para productos cárnicos crudos y para productos RTE se conseguiría con tratamientos que ocasionaran, respectivamente, 6 y 4 reducciones decimales del número de células.

4. Consecución del FSO

4.1. Consecución del FSO para *E. coli* O157:H7

A la vista, por una parte, de los datos publicados (resumidos en la tabla 1 recogida en el apéndice I) acerca de la resistencia en matrices alimentarias de *E. coli* O157:H7 frente a la acción letal de las altas presiones y, por otra, el FSO ($-2,4 \log_{10}$ u.f.c. g^{-1}) que se requiere alcanzar (equivalente a 4,4 reducciones decimales), para conseguir, desde un punto de vista microbiológico, un producto cárnico seguro, puede concluirse que se necesitarían tratamientos superiores a 600 MPa para lograr el FSO en los productos cárnicos crudos. Con ello, en los alimentos que lo requieran, se salvaguarda la posibilidad de un cocinado con calentamiento insuficiente. En el caso de productos cocidos procesados industrialmente y otros alimentos RTE que se manipulan después de su procesado sería suficiente un tratamiento de 300 - 400 MPa, dado que en este caso el tratamiento tendría que reducir la tasa de *E. coli* O157:H7 sólo 2,4D.

4.2. Consecución del FSO para *Listeria monocytogenes*

A la vista, por una parte, de los datos publicados (resumidos en la tabla 1 del apéndice I) acerca de la resistencia en matrices alimentarias de *L. monocytogenes* frente a la acción letal de las altas presiones y, por otra, la tasa de bacterias (10^{-3} u.f.c. g^{-1}) que se requiere conseguir para lograr, desde un punto de vista microbiológico, un producto cárnico crudo seguro, puede concluirse que difícilmente se alcanzaría el objetivo aplicando solamente altas presiones, ya que sería necesario reducir el número de células en 6D para lo que se requerirían presiones superiores a 600 MPa.

Sin embargo, si se trata de alimentos que han sido procesados (jamón cocido, mortadelas, jamón curado, embutidos, otros productos RTE, etc.) que se preparan después para su distribución al consumidor (lonchas, piezas pequeñas, granulados como ingredientes de alimentos RTE, etc.) la situación es totalmente diferente. La potencial contaminación del producto por *L. monocytogenes* post-proceso y el carácter psicrotrofo de esta bacteria hace que no sea posible asegurar que el alimento que llega al consumidor posea un número de células inferior a 100 u.f.c. g^{-1} . Por ello, en el presente caso, la aplicación de altas presiones (500 MPa) permitiría claramente reducir 4D el número de células de

L. monocytogenes y alcanzar así un adecuado ALOP. Las altas presiones pueden ser, pues, un método extremadamente útil para librar al mercado productos RTE finales seguros.

En la actualidad, se está aplicando un tratamiento de 400 MPa durante unos minutos para reducir el número de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado para su exportación. Este tratamiento ocasiona 3 reducciones decimales y los análisis de control que se ha realizado no han detectado el microorganismo (Tapiador, 2004). Asimismo, se ha informado que en salchichas frankfurt, un tratamiento de este nivel (400 – 500 MPa durante 9 minutos) provoca una reducción del número de *L. monocytogenes* de 5 unidades logarítmicas (Shellhammer y Yousef, 2000) y que presurizaciones (600 MPa durante 6 minutos) aplicadas a jamón cocido, jamón curado y carne de vacuno marinada reduce de forma importante la tasa de *L. monocytogenes* hasta tal punto que, en comparación con muestras controles, se observa ausencia en 25 g tras 120 día de almacenamiento bajo refrigeración (Garriga y col., 2003).

En ambos casos (*E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*), como al aumentar la temperatura del tratamiento en unos pocos grados (una decena, por ejemplo) se incrementa notablemente la sensibilidad de las dos bacterias a la acción letal de las altas presiones, se hace especial énfasis en que se aplique el tratamiento a temperatura más elevada (40 – 50 °C), siempre que los atributos del alimento lo permitan, lo que ayudaría a conseguir el FSO.

Conclusiones

En el estado actual de desarrollo, las altas presiones no pueden utilizarse para conseguir la esterilidad comercial de la carne y productos cárnicos. Sólo pueden emplearse como medio de lograr la higienización de los mismos.

Los microorganismos de mayor importancia sanitaria en los productos cárnicos y que, por razones de manorresistencia, han de fijar la intensidad de los tratamientos por altas presiones son *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*.

En los productos cárnicos crudos que, dados sus atributos sensoriales y propiedades bioquímicas, permitan la aplicación de altas presiones, es difícil conseguir el FSO en relación con ambas bacterias, ya que sería necesario aplicar presurizaciones muy elevadas, del orden de 700 – 800 MPa.

Los productos cárnicos listos para su consumo elaborados a partir de alimentos procesados pueden contaminarse durante su manipulación post-proceso (loncheado, laminado, preparación de piezas domésticas, envasado en raciones, etc.). La aplicación de altas presiones en ellos es de gran utilidad para alcanzar el FSO, lo que se lograría con presurizaciones de 400 – 500 MPa durante varios minutos. Se conseguiría así la obtención de productos seguros.

Siempre que los atributos del alimento lo permitan, la aplicación de altas presiones a temperaturas más elevadas (por ejemplo, 30 - 50 °C) que las de refrigeración o ambiente ayudaría a conseguir el FSO.

Referencias

AGA (American Gastroenterological Association) (1994). Consensus Conference Statement. *E. coli* O157:H7 Infections: an emerging national health crisis. July 11 – 13.

- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C.P. y Ray, B. (1999). Variation resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4248 – 4251.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F. y Ray, B. (2000). Interaction of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of food borne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 33 – 42.**
- Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P., eds. (1992). *High Pressure and Biotechnology*. J. Libbey, London.
- Barbosa-Cánovas, G.V. y Gould, G.W. 2000. *Innovation in food processing. Food preservation technology series*. Techomic. Basel.
- Basset, J., Lépine, P., and Chaumont, L. (1956). Effet des hautes pressions sur le virus de la poliomyélite (source Lansing). *Ann. Inst. Pasteur* 90, 575 – 596.
- Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M. A., Robinson, T. P. y Mackey, B. M. (1999) Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7 to high pressure, mild heat, and other stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1565 – 1569.
- Buchanan, R. L., Damert, W. G., Whiting, R. C. y van Schothorst, M. (1997) The use of epidemiologic and food survey data to estimate a conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. *J. Food Prot.* 60, 918 – 922.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Gervilla, R., Yuste, J. and Guamis, B. (2000). Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese. *Food Microbiol.*, 17, 633-641.
- CDCP (Centers for Diseases Control and Prevention) (2000). Preliminary FoodNet data on the incidence of food-borne illness-selected sites, United States, 1999. Morbidity and Mortality Weekly Report, 49, 2001 – 2005.
- CDCP (Centers for Diseases Control and Prevention) (2003). Disease information. Listeriosis. Revised 01/12/03. http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_g.htm.
- Cerf, O. (1977). Tailing in survival curves of bacterial spores. *J. Appl. Microbiol.* 42, 1 – 20.
- Crossland, B. (1995). The development of high pressure equipment. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D.E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Chapman, P. A. (2000) Sources of *Escherichia coli* O157 and experiences over the 15 years in Sheffield, UK. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement*, 88, 515 – 605.
- Cheftel, J. C. (1995) Review: High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci Technol. Int.* 1, 75 – 90.
- Doyle, E. (1999) Use of high pressure to control *Listeria* in meat. <http://www.amif.org/Listeria%20Pressure.pdf>
- Earnshaw, R. G. (1995) High pressure microbial inactivation kinetics. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Earnshaw, R. G., Appleyard, J. y Hurst, R. M. (1995) Understanding physical inactivation processes – combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *Int. Food Microbiol.* 28, 197 – 219.
- Farber, J. M. y Peterkin, P. I. (1999). Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. En: "Listeria, listeriosis and food safety". 2ª ed. Eds. E. T. Ryser y E. H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Farkas, D. F. y Hoover, D. G. 2000. High pressure processing. En "Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technology. *J. Food Sci. Special Supplement*. 65, 14 – 16.
- Fedorov, V. V. (1972) Theory of optimal experiments. Academic Press. New York.
- FDA (US Food and Drug Administration) (1999) Food Code. Washington D. C. US Department of Health and Human Service, Public Health Service. Food and Drug Administration.
- FDA (US Food and Drug Administration) (2001) Food Code. Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Center for food safety and applied nutrition. Washington D.C. US Department of Health and Human Service.

- García-Graells, C., Valckx, C. y Michiels, C. W. (2000). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatments high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4173 –4179.
- García-Graells, C., Van Opstal, I., Vanmuysen, S. C. M. y Michiels, C. W. (2003). The lactoperoxidase systems increases efficacy of high pressure inactivation of foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 81, 211 –221.
- Garriga, M.; Aymerich, M. T., Costa, S., Monfort, J. M. y Hugas, M. (2002) Bactericidal synergisms through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food. Microbiol.*, 19, 509 – 518.
- Garriga, M.; Marcos, B. Aymerich, M. T. y Hugas, M. (2003) Prospectiva de aplicación de altas presiones para la minimización de riesgos asociados a *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en embutidos madurados en frío. Eurocarne. XII. 121, 93 – 99.
- Gervilla, R., Capellas, M., Ferragut, V. y Guamis, B. (1997). Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. *J. Food Prot.* 60, 33 – 37.
- Gervilla, R., Ferragut, V. y Guamis, B. (2000). High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents *J. Dairy Sci.* 83, 674 – 682.
- Glass, K. A. y Doyle M. P. (1989). Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1565 – 1569.
- Hashizume, C., Kimura, K y Hayashi, R. (1996) Kinetics analysis of yeast inactivation by high pressure treatment at low temperature. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1455 – 1458.
- Hayashi, R. y Balny, C. (1996). High Pressure Bioscience and Biotechnology. Elsevier. Amsterdam.
- Heinz, V. y Knorr, D. (1996) High pressure inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* cells by a three-state-model considering distributed resistance mechanisms. *Food Biotechnol.*, 10, 149 – 161.
- Hite, B. H. (1899) The effect of pressure on the preservation of milk. West Virginia Univ. *Agric. Exp. Sta. Bull.*, 58, 15 – 35.
- Hite, B. H., Giddings, N. J. y Weakly, C. E. (1914) The effect of pressure on certain microorganisms encountered in preserving fruits and vegetables of milk. West Virginia Univ. *Agric. Exp. Sta. Bull.*, 146, 3 – 67.
- Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A. M., Farkas, D. F. y Knorr, D. (1989) Biological effects of high hydrostatic pressure. *Food Technol.*, 43, 99 – 107.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (1996). Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. 299 – 333. Chapman & Hall. London.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (2002). Microorganisms in foods 7. Microbiological testing in food safety management 313 – 332. Kluwe Academic Plenum Publishers & Hall. New York.
- Isaacs, N. S., Chilton, P. y Mackey, B. (1995). Studies on the inactivation by high pressure of microorganisms. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Jaenicke, R. (1991) Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* 202, 715 –728.
- Johnston, D. E. (1995) High pressure effects on milk and meat. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Jurkiewicz, E., Villas-Boas, M., Silva, J. L., Weber, G., Hunsmann, G., and Clegg, R. M. (1995). Inactivation of simian immunodeficiency viruses by hydrostatic pressure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 6935-6937.
- Kaddu-Mulindwa, D., Aisu, T., Gleier, K., Zimmermann, S. y Veutin, L. (2001). Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faecal samples from children with diarrhoea and from healthy zebu cattle in Uganda. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 95- 101.
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C. P. y Ray, B. (1994). Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4174 – 4177.

- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C. P. y Ray, B. (1998). Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 61, 425 – 431.
- Kalchayanand, N., Ray, B., Sikes, T. y Dunne, C. P. (2001). Complete destruction of *Listeria monocytogenes* in hot dogs by hydrostatic pressure and bacteriocin-based biopreservatives. University of Wyoming Annual Science Research Report 2001.
- Karatzas, K. A., Kets., Smid, E. P. W. y Bennik, M. H. (2001) The combined action of carvacrol and high pressure on *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 90, 463 - 469.
- Karatzas, K. A. G., y Bennik, M. H. (2002) Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3183 - 3189.
- Karch, H., Russmann, H., Schmidt, H., Schwarzkopf, A y Heesemann, J. (1995). Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on diarrheal diseases. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1602 – 1605.
- Kingsley, D. H., Hoover, D. G. Papafragkou, E. and Richards, G.P. (2002). Inactivation of hepatitis A virus and a Calicivirus by high hydrostatic pressure. *J. Food. Prot.*, 65, 1605-1609.
- Knorr, D. (2000). Process aspect of high pressure treatment of food systems. En "Innovations in food processing" Eds. G. V. Barbosa-Cánovas y G. W. Gould. Technomic Pub Co., Inc. Basel.
- Larson, W. P., Hartzell, T. B., y Diehl, H. S. (1918) The effect of high pressures on bacteria. *J. Infec. Dis.*, 22, 271 – 281.
- Ledward, D. A. (1995) High pressure processing -The potential. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Ledward, D. A., Johnson, D. E., Earnshaw, R. G. y Hasting, A. P. M. (1995). High pressure processing of foods (eds.). Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Linton, M., McClements, J. M. J. y Patterson, M. F. (1999) Survival of *E.coli* O157:H7 during storage of treated orange juice. *J. Food Prot.*, 62, 1038 – 1040.
- Mackey, B. M., Forestiere, K., Isaacs, N.S., Stenning, R. y Brooker, B. (1994). The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Let. Appl. Microbiol.*, 19, 429 - 432.
- Mackey, B. M., Forestiere, K., Isaacs, N. (1995). Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnol.*, 9, 1 – 11.
- McClements, J. M. J., Patterson, M. F. y Linton, M. (2001). The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *J. Food Prot.*, 64, 514-522.
- McMeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T. y Ratkowsky, D.A. (1993). En "Preductive Microbiology: theory and applications" John Willey and Son. New York.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Michiels, C.W. (2001a). High pressure increases bacterial activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *Int. Food Microbiol.*, 64, 325 – 332.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Van Haver, E. G. R. y Michiels, C. W. (2001b). Inactivation of gram negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 339 – 344.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1999) Food related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607 – 625.
- Meng, J., Doyle, M., Zhao, T. y Zhao, S. (2001). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. En: "Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers" 2ªed. Eds. M.P. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville. ASM Press. Washington D.C.
- Mossel, D. A. A., Corry, J. E. L., Struijk, C.B. y Baird, R.M. (1995). Factors affecting the fate and activities on microorganisms in foods. En "Essentials of the Microbiology of foods" - A textbook for advances studies. Eds. D.A.A. Mossel, J. E. L. Corry, C. B. Struijk and R. M. Basird). John Willey and Son.
- Mussa, D. M., Ramaswamy, H. S., Smith, J. P. (1999). High pressure destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* on pork. *J. Food Prot.*, 62, 40 - 45.

- Nakayama, A., Yano, Y., Kobayashi, S., Ishikawa, M. y Sakai, K. (1996) Comparison of pressure resistances of spores of six *Bacillus* strains with their heat resistances. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3897 – 3900.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P. y Chackraborty, T. (1998). Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 61, 244 – 248.
- Oliveira, A. C., Valente, A. P., Almeida, F. C. L., Lima, S. M. B., Ishimaru, D., Gonçalves, R. B., Peabody, D., Foguel, D., Silva, J. L. (1999). Hydrostatic pressure as a tool to study virus assembly: pressure-inactivation of viruses by formation of fusion intermediate states. En "High Pressure Molecular Science". Eds. R. Winter, y J. Jonas, 497-513. NATO Science Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Opstal, van I., Suzy, C. M. y Vanmuysen, C. W. M. (2003). High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. *Int. J. Food Microbiol.*, 88, 1 – 9.
- O'Reilly, C. E., O'Connor, P. M., Kelly, A. L., Beresford, T. P. y Murphy, P. M. (2000). Use of Hydrostatic Pressure for Inactivation of Microbial Contaminants in Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4890–4896.
- Oxen, P. y Knorr, D. (1993) Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *Lebens. Wissens. Technol.*, 23, 220 – 223.
- Pagan, R. y Mackey, B. (2000) Relationship between membrane damage and cell death in pressure treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential and stationary phase cells and variation among strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2829 – 2834.
- Palou, E., López-Malo, A.; Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. 2002. El tratamiento de alta presión en la conservación de alimentos. En "Manual de conservación de alimentos". M. S. Rahman (ed). Acribia. Zaragoza.
- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, M. y Gilmour, A. (1995a). Effect of high pressure on vegetative pathogens. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, M. y Gilmour, A. (1995b) The sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. *J. Food Prot.*, 58, 542 – 529.
- Pontes, L., Fornells, L. A., Giongo, V., Araujo, J. R. V., Sepulveda, A., Villas-Boas, M., Bonafe, C. F. S., and Silva, J. L. (1997). Pressure inactivation of animal viruses: potential biotechnological applications. En "High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology". Ed. Heremans, K. 91-94. Leuven University Press, Leuven, Belgium.
- Reddy, N. R., Solomon, H. M., Fingerhut, G. A., Rhodehamel, E. J. y Balasubramanian, V. M. (1999) Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. *J. Food Saf.*, 19, 277 – 288.
- Reichert, J. E. (1987). Tratamiento térmico de los productos cárnicos. Acribia. Zaragoza.
- Ritz, M., Jugiau, F., Rama, F., Courcoux, P., Semenou, M. y Federighi, M. (2000) Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. *Food Microbiol.*, 17, 375 –382.
- Ritz, M., Tholozan, J., Federighi, M. y Pilet, M. F. (2002) Physiological damage of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure. *Food Microbiol.*, 79, 47 – 53.
- Rocourt, J. (1999). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. En: "Listeria, listeriosis and food safety". 2ª ed. Eds. E. T. Ryser y E. H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Rodriguez, J. J., Sepulveda, D. R., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. G. (2000). Combined effect of high hydrostatic pressure and water activity on *E. coli* inhibition. 2000 meeting of the Institute of Food Technologists. Dallas. Abstract 86H-5.
- Rovere, P. (1996) Prove di sterilizzazione a 15000 bar per ottenere la stabilita microbiologica ed enzimatica. *Ind Aliment.*, 35, 1062 - 1065.
- Rovere, P., Miglioli, L., Lonneborg, N. G., Sacaramuzza, N. y Gola., S. (1998) Modeling and calculation of the sterilising effect in high pressure heat treatments. *Ind. Conser.*, 73, 303 – 315.

- Sale, A. J. H., Gould, G. W. y Hamilton, W. A (1979). Inactivation of bacterial spores by hydrostatic pressure. *J. Gen. Microbiol.*, 60, 323 – 334.
- SCVPH (Scientific committee on veterinary measures relating to public health) (1999) Opinion on *Listeria monocytogenes*. Adopted on 23 September 1999.
- Shigehisa, T., Ohmori, T., Saito, A., Taji, S., y Hayashi, R. (1991) Effects of high pressure on the characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 12, 207 – 216.
- Silva, J. L. and Weber, G. (1988). Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *J. Mol. Biol.* 199, 149-159.
- Silva, J. L., Luan, P., Glaser, M., Voss, E. W., and Weber, G. (1992). Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. *J. Virol.* 66, 2111-2117.
- Simpson, R. K. y Gilmour, A. (1997a) The effect of high pressure on *Listeria monocytogenes* on phosphate buffered saline and model food systems. *J. Appl. Microbiol.* 83, 181 – 188.
- Simpson, R. K. y Gilmour, A. (1997b) The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods phosphate buffered saline and model food systems. *Food. Microbiol.*, 14, 567 – 573.
- Smelt, J. P. P. M. (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.*, 9, 152 – 158.
- Smelt, J. P. P. M, Rijke, A. G. F. y Hayhurst, A. (1994). Possible mechanism of high pressure inactivation of microorganisms. *High Press. Res.*, 12, 199 – 203.
- Sojka, B. y Ludwig, H. (1997). Effects of pressure changes on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *Pharm Ind.*, 59, 436 – 438.
- Sonoike, K., Setoyama, T., Kuma, y. Kobayashi, S. (1992). The effect of pressure and temperature on the death rates of *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli*. En "High Pressure and Biotechnology". Eds. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans y P. Masson. Jhon Libby and Co. London.
- Styles, M. F., Hoover, D. G. y Farkas, D. F. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.*, 56, 1404 – 1407.
- Tapiador, J. (2004) Comunicación personal.
- Tarr, P. I. (1994) Testimony to Washington State Senate. Department of Agriculture. January 20.
- Tay, A., Yousef, A. E., Shellhammer, T. H., Nienaber, U. y Chism, G.W. (2002) Variation in resistance of *Listeria monocytogenes* strains to high pressure processing. Annual Meeting and Food Expo. Anaheim. California http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_12757.htm
- Tewari, G., Jayas, D. S., and Holley, R.A. 1999. High pressure processing of foods: an overview. *Sci. Aliments* 19: 619-661.
- Tholozan, J. L.; Ritz, M.; Jugiau, F.; Federighi, M y Tissier, J. P. (2000) Physiological effects of high hydrostatic pressures treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *J. Appl Microbiol*, 88, 202 – 212.
- Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J. A, Sleator R. D., Gahan C. G. M., Hill, C. y Abbe T. (2002). Multiple deletions of the dsMolte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. *Appl Environ. Microbiol.*, 68, 4710–4716.
- Wenger, J. D., Swaminathan, B., Hayes, P. S., Green, S. S., Pratt, M., Pinner, R.W., Schuchat, A. y Broome, C. V. (1990) *Listeria monocytogenes* contamination of turkey franks: evaluation of a production facility. *J. Food. Prot.*, 53, 1015 – 1019.
- WHO (World Health Organization) (1997). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections (WHO/FSF/FOS/97.6). Geneva. Food safety unit. Program of food safety and food aid. World Health Organization.
- Wilson, J. B., Clarke, R. C., Renwick, S. A., Rahn, K., Johnson, R. P., Karmali, M. A., Lior, H., Alves, D., Gyles, C. L., Sandhu, S., McEwen, S. A. y Spika, J. S. (1996) Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *J. Infect. Dis.*, 174, 1021- 1027.

- Wouters, P. C., Glaasker, E. y Smelt, J. P. P. M. (1998) Effects of high pressure inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 509 – 514.
- Yuste, J., Mor.Mur, M., Capellas, M. y Pla, R. y (1999) *Listeria innocua* and aerobic mesophiles during chill storage of inoculated mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure. *Meat Sci.*, 53, 251 – 257.
- Yuste, J., Capellas, M., Pla, R., Fung, D. Y. C. y Mor-Mur, M. 2001. High Pressure Processing for food safety and Preservation: A review. *J. Rap. Meth. Automat. Microbiol.* 9, 1-10.
- Zhao, T., Doyle, M. P., Shere, J. y Garber, L. (1995). Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in survey of dairy herd. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1290 – 1293.

Apéndice I

Manorresistencia aproximada de distintas bacterias de interés sanitario

Tabla 1.- Manorresistencia (log ciclos de reducción tras 15 min de tratamiento)

aproximada a 20-25°C de distintas bacterias de interés sanitario

Bacteria	Medio	Presión (MPa)				
		200	300	400	500	600
<i>L. monocytogenes</i>	Tampón	0,4	1	4 - 7	6 - 9	> 10
	Matriz alimentaria	-	-	1 - 3	3 - 6	
<i>E. coli</i> O157:H7	Tampón	-	1	2 - 4	-	6 - 8
	Matriz alimentaria	-			3	> 5
<i>Salmonella</i> spp	Tampón	-	4 - 6	6 - 8	> 10	-
	Matriz alimentaria	-	3 - 4	6	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	Tampón	-	6	-	-	-
	Matriz alimentaria	-	6	-	-	-
<i>Staph. aureus</i>	Tampón	-	-	5	-	-
	Matriz alimentaria	-	-	0,5	2	2 - 6
<i>C. jejuni</i>	Tampón	-	6	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp	-	-	> 6	-	-	-

Preparada con datos de Metrick y col., 1989; Patterson y col., 1995a; Shigesia y col., 1991; Styles y col., 1991; Simpson y Gilmour, 1997a; Simpson y Gilmour, 1997b; Smelt, 1998; Ritz y col., 2000; Alpas y col., 1999; Murano y col., 1999; Kalchayanand y col., 2001; Ritz y col., 2002; Shao y col., 2003.

Nota.- Los datos de esta tabla deben tomarse con precaución porque muestran la manorresistencia a temperaturas medias, próximas a las óptimas de crecimiento. Al desviarse de la temperaturas óptimas puede, en algunos casos, modificarse la manorresistencia significativamente.

Referencias

- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C. P. y Ray, B. (1999). Variation resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4248 - 4251.
- Kalchayanand, N., Ray, B., Sikes, T. y Dunne, C.P. (2001). Complete destruction of *Listeria monocytogenes* in hot dogs by hydrostatic pressure and bacteriocin-based biopreservatives. University of Wyoming Annual Science Research Report 2001.
- Metrick, C., Hoover, D. G. y Farkas, D. F. (1991). Effects of high hydrostatic pressure on heat resistance and heat sensitive strains of *Salmonella*. *J. Food Sci.*, **54**, 1547 - 1564.
- Murano, E. A., Murano, P. S., Brennan, R. E., Shenoy, K., Moreira, R. G. (1999) Application of high hydrostatic pressure to eliminate *Listeria monocytogenes* from fresh pork sausage. *J. Food Prot.*, **62**, 480 - 483.
- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, M. y Gilmour, A. (1995). Effect of high pressure on vegetative pathogens. En "High pressure processing of foods". Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnson, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press. Loughborough. Reino Unido.
- Shao, Y., Ramaswamy, H. S. y Smith, J. P. (2003) Kinetics of high pressure destruction of *E.coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in cheese. 2003 IFT Annual Meeting, Chicago.
http://ift.confex.com/ift/2003/techprogram/paper_18547.htm
- Shigeisa, T., Ohmori, T., Saito, A., Taji, S., y Hayashi, R. (1991) Effects of high pressure on the characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, **12**, 207 – 216.
- Simpson, R. K. y Gilmour, A. (1997a) The effect of high pressure on *Listeria monocytogenes* on phosphate buffered saline and model food systems. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 181 – 188.
- Simpson, R. K. y Gilmour, A. (1997b) The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods phosphate buffered saline and model food systems. *Food. Microbiol.*, **14**, 567 – 573.
- Smelt, J. P. P. M. (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.*, **9**, 152 – 158.
- Styles, M. F., Hoover, D. G. y Farkas, D. F. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.*, **56**, 1404 – 1407.

Consideraciones particulares acerca de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*.

Staphylococcus aureus.

El género *Staphylococcus* comprende una veintena de especies, muchas de las cuales contaminan los alimentos a partir de fuentes humanas, animales o ambientales. Sin embargo, *Staph. aureus* es patógeno para el hombre por vía digestiva, no por la ingestión de bacterias vivas sino merced a las enterotoxinas que producen durante su multiplicación en los alimentos contaminados. *Staph. aureus* es una bacteria ubicua, siendo el principal reservorio el hombre de tal forma que la persona colonizada es portadora de estafilococos, lo que supone una diseminación de los mismos a otros individuos o alimentos.

Uno de los aspectos más interesante de esta bacteria es el número de células que se requiere para producir enterotoxinas hasta niveles peligrosos. Es un aspecto que se ve influido por muchas variables (cepa, composición del alimento, temperatura, pH, Eh, a_w , presencia de inhibidores, etc.) y, por ello, no se puede ofrecer un número con precisión. A pesar de ello, hay unas pautas que son útiles para evaluar el riesgo. De acuerdo con la FDA se consigue una tasa efectiva de enterotoxinas cuando el número de células de *Staph. aureus* es superior a 10^5 g^{-1} (Jablonski y Bohach, 2001) aunque otros estudios (Holmberg y Blaque, 1984) consideran una tasa superior (entre 10^5 g^{-1} y 10^8 g^{-1}). De la misma forma, tampoco se conoce la cantidad de enterotoxina necesaria para que se presenten los síntomas pero se acepta generalmente que está comprendida entre 0,1 y 1 mg kg^{-1} (Everson y col., 1988).

Staph. aureus compite pobremente con otras bacterias y, en consecuencia, rara vez causa intoxicación alimentaria en los alimentos frescos siendo más frecuente en alimentos que se han cocinado y contaminado después que se han mantenido algunas horas entre 20–40 °C a una temperatura adecuada para su multiplicación. Entre ellos, pasteles de crema, carnes cocidas, mariscos y otros platos preparados con anticipación (Roberts, 1982). *Staph. aureus* se destruye fácilmente mediante la cocción pero no sus enterotoxinas.

Es una de las bacterias patógenas más resistente a bajas a_w , pudiendo permanecer viable por largos periodos en materiales deshidratados. Su osmotolerancia le permite crecer y producir toxinas a a_w de 0,86 (ICMSF, 1996). Crece óptimamente entre 37 y 40°C pero a 10°C presenta una larga fase de latencia, superior a 20 horas (Broughall y Brown, 1984) y cuando crece, lo hace lentamente, habiéndose descrito, a esa temperatura, valores g en condiciones ambientales normales (elevada a_w y pH próximo a la neutralidad) de 13,4–21,6 horas en leche (Broughall y Brown, 1984) y algo menores (4,9–5,7) en una mezcla de carne y riñón (ICMSF, 1996). Estos valores son más desfavorables si las condiciones del medio se combinan con otros factores disgenésicos. Además, las enterotoxinas se producen en un intervalo más estrecho de temperaturas. Por ejemplo, en jamón cocido se detecta la toxina en 2–3 días cuando se almacena entre 20 y 30°C pero a 10°C se prolonga el tiempo hasta más de 4 semanas e incluso, a veces, 16 semanas. (Genigeorgis y col., 1967).

Escherichia coli O157:H7.

Escherichia coli es una especie de la familia *Enterobacteriaceae* que forma parte de la microbiota anaerobia normal del intestino humano y de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas, son pues, apatógenas. Sin embargo, algunas producen enfermedades diarreicas. Los serotipos difieren unos de otros en tres antígenos: el somático (O), el flagelar (H) y el de la cápsula (K). Los serotipos de mayor patogenicidad se agrupan de acuerdo con su virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos y diferencias entre los antígenos O:H. Estos grupos constan de *E. coli* enteropatógeno (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enteroinvasivo (EIEC), de adherencia difusa (DAEC), de agregación entérica (EAEC) y enterohemorrágico (EHEC). Este último es el que provoca la enfermedad más grave y a él pertenece el serotipo *E. coli* O157:H7. Se identificó por vez primera en 1982 (Wells y col., 1983). Este serotipo de la especie es muy peculiar, ya que no comparte las características comunes de otros *E. coli*. Entre ellas, no crece bien en los medios de cultivos normales y tampoco lo hace a 44,5 °C, no produce b-glucuronidasa y no fermenta el sorbitol (Doyle y Paddy, 1989). Porta un plásmido de 60 MDa. Los otros serotipos distintos al O157:H7 no comparten estas características pero sí tienen en común la producción de toxina Shiga (Griffin, 1995).

Al contrario que otros muchos patógenos, *E. coli* O157:H7 tolera ambientes ácidos, pudiendo multiplicarse a pH de 4,0 - 4,5 aunque esta peculiaridad depende de la interacción de pH con otros factores. Si *E. coli* O157:H7 está presente en números elevados, puede sobrevivir a la fermentación (p.e. en embutidos a pH de 4,5) durante al menos 2 meses (Leyer y col., 1995; Cheville y col., 1995), en mayonesa (pH entre 3,6 y 3,9) durante 5 - 7 semanas (Zhao y Doyle, 1994) y en zumo de manzana (pH 3,6 - 4,0) durante 10 - 31 días (Zhao y col., 1993) y puede sobrevivir a su paso por el estómago (Arnold y Kaspar, 1995). Esta ácido tolerancia se debe a tres sistemas inducidos: uno oxidativo, otro arginina dependiente y el tercero glutamato dependiente (Lin y col., 1996).

E. coli O157:H7 presenta, sin embargo, una termorresistencia similar a la de otros serotipos y normal de acuerdo con su carácter de Gram negativa, es decir, es bastante termolábil, con unos parámetros térmicos en carne similares (Doyle y Schoeni, 1984), o ligeramente menores (ICMSF, 1996), a los de *Salmonella* spp. (Goodfellow y Brown, 1987). De aquí, que los tratamientos térmicos aplicados para destruir las salmonelas sean también suficientes para eliminar *E. coli* O157:H7. Se han descrito valores D de 270, 45, 24 y 9,6 segundos a las temperaturas de 57,2; 60,0; 62,8 y 64,3°C, respectivamente (Doyle y Schoeni, 1984). La grasa presente en la carne protege contra la acción letal del calor pero, aún así, siguen siendo bastante termolábiles. Por ejemplo, en carne de vacuno picada con un 30% de grasa los valores D a 57,2 y 62,8°C pasan a ser, respectivamente, de 318 y 28 segundos (Line y col., 1991). En conclusión, puede decirse que no ha de preocupar las células supervivientes a un tratamiento térmico insuficiente pues el que se debería aplicar para otras bacterias más termorresistentes, por ejemplo, *L. monocytogenes*, es apto para reducir el número de *E. coli* O157:H7 hasta niveles estadísticamente despreciables.

Es muy sensible también a los medios con a_w ligeramente reducida. Cesa su crecimiento a valores de la a_w de alrededor de 0,95 (ICMSF, 1996).

El reservorio más importante de *E. coli* O157:H7 es el ganado vacuno donde su prevalencia es elevada, habiéndose detectado en el 36% de vacas y 57% de terneras de 80 cabezas analizadas en

Canadá (Wilson y col., 1996) y en el 3,2% de 191 terneras estudiadas en EEUU (Zhao y col., 1995). Además, se ha observado que la prevalencia es mayor en verano que en invierno, lo que se correlaciona con la incidencia de la enfermedad (Meng y col., 2001). Por ejemplo, en un estudio realizado en el Reino Unido en 1997 se observó que se detectaba *E. coli* O157:H7 en el 38% de las vacas dispuestas para el sacrificio en primavera mientras que, entre los animales sacrificados en invierno, sólo en el 4,8% se detectó la bacteria (Meng y col., 2001). Aunque de forma general se considera que el ganado vacuno es el principal reservorio, también se han detectado en otros animales de abasto, domésticos y silvestres, como ovejas, cabras, cerdo, caballo, perros, gatos, ratas, ciervo, gaviota, etc. (Chapman, 2000) e incluso en cebú (Kaddu-Mulindwa y col., 2001). De estas fuentes, la más importante es la oveja, cuya prevalencia se aproxima a la del ganado vacuno, habiéndose descrito prevalencias del 31% en Junio, 5,7% en Agosto y 0% en Noviembre (Kudva y col., 1996).

E. coli O157:H7 es la bacteria causante de una grave enfermedad que cursa con colitis hemorrágica, dolores abdominales, síndrome urémico hemolítico (HUS) que se manifiesta con diarrea sangui-nolenta, nefropatía aguda, postración, coma y muerte. Al menos 30 países de los 5 continentes han detectado la enfermedad con una tendencia creciente aunque ello quizás se deba, al menos en parte, a una mayor vigilancia por parte de las autoridades sanitarias y a una mejora de los medios de detección del microorganismo. En EEUU por ejemplo, se denunciaron 2 brotes en 1982, 17 en 1992, 2 en 1996 y 42 en 1998. No obstante, muchos enfermos con síntomas leves (diarreas suaves y no hemorrágicas) no prestan excesiva atención a la enfermedad y tales casos no se registran. Los informes FoodNet indican que en EEUU se presentaron anualmente entre 2,1 y 2,8 casos por cada 100.000 habitantes en el periodo 1996 – 1999 (CDCP, 2000), estimándose una incidencia anual que abarcó a 73.480 enfermos con 61 muertes (Mead y col., 1999) de los cuales el 85% se atribuyen a transmisión alimentaria (Meng y col., 2001). El mayor brote que se ha producido a nivel mundial fue en Japón en 1996 por consumo de brotes de rábano, en el que se vieron afectadas 11.000 personas (Michino y col., 1998) y el caso con mayor número de muertes se produjo en Escocia por el consumo de carne cocida, donde murieron 21 personas de las 501 afectadas (Ahmed y Donaghy, 1998).

Los recuentos realizados en los alimentos causantes de brotes de enfermedad han revelado que el número de células necesario para que se produzca la enfermedad es muy bajo. En todos los casos se han detectado entre 0,3 y 15 células g^{-1} de producto (FSIS, 1993; Nauta y col., 2001). Por ello, se acepta de forma general que la dosis infectiva es menos de 100 células (ICMSF, 2002). Esta dosis es más baja (probablemente unas 10 células) en individuos especialmente susceptibles, como inmunocomprometidos, ancianos, niños, etc. (Meng y col., 2001; ICMSF, 2002). Por ejemplo, en niños se ha estimado que el riesgo es 2,5 veces superior que el de los adultos (FSIS, 2002).

E. coli O157:H7 se ha detectado en la carne procedente de los diferentes animales de abasto aunque la prevalencia en la de unos y otros es diferente. La prevalencia en la carne picada de vacuno y ovino llega hasta el 6% mientras que en la carne de cerdo y de ave es menor, habiéndose observado, respectivamente, valores del 1,5% y 4% (SCVPH, 2003). Como el tracto intestinal de estos animales, principalmente el del ganado vacuno, es el reservorio natural, la contaminación de la carne, mataderos e industrias se produce durante el sacrificio, primero la canal y de aquí, mediante las operaciones posteriores de carnización, las bacterias pasan a los cortes que se practican para su comercialización.

De acuerdo con este modelo de contaminación, puede deducirse que la localización de las bacterias es superficial en las piezas cárnicas, incluidos los filetes domésticos. Sin embargo, en algunos productos, como la carne picada y las hamburguesas, los microorganismos están distribuidos también en el espesor de la pieza. Realmente, son las hamburguesas cocinadas insuficientemente (infracalentadas) la causa común de los brotes de *E. coli* O157:H7 que se han producido en EEUU (Meng y col., 1991; Anónimo, 1993). Hay que añadir, además, la posibilidad de contaminaciones cruzadas a otros alimentos; entre ellos los listos para su consumo (RTE: "ready-to-eat") en cocinas y establecimientos de suministro a la población y de servicios colectivos (ICMSF, 2002). La carne y muchos productos cárnicos tanto a nivel doméstico como industrial se someten a tratamiento térmico para, respectivamente, su consumo en el hogar, comedores colectivos, restaurantes, etc. o para su distribución a la población en ultramarinos, supermercados, etc., lo que conlleva que, si se produce una contaminación, el número de células será siempre más bajo que en las hamburguesas. Otros productos no sufren tratamiento térmico alguno. Tal es el caso de los embutidos fermentados. En EEUU se han asociado algunos brotes de *E. coli* O157:H7 al consumo de "summer sausages" (CDCP, 1994), lo que se ha explicado teniendo en cuenta la tolerancia de *E. coli* O157:H7 a los bajos pH pero se ha demostrado experimentalmente que concentraciones de nitrito de 200 mg ml⁻¹ inhiben totalmente el crecimiento de la bacteria (Tsai y Chou, 1996) y, por otra parte, la a_w (< 0,92) de los embutidos madurados impide el crecimiento de *E. coli* O157:H7, ya que 0,95 es el valor mínimo para su multiplicación (ICMSF, 1996). Puede decirse, pues, que son las hamburguesas y productos similares los derivados cárnicos que más preocupan en relación con la presencia de *E. coli* O157:H7. Siempre hay que suponer que en ocasiones se cocinen aplicando un tratamiento térmico insuficiente.

Listeria monocytogenes.

Aunque *L. monocytogenes* se describió hace cerca de 80 años (Murray y col., 1926) y se conocía la listeriosis, la enfermedad transmitida por los alimentos, sin embargo, no adquirió importancia hasta las últimas dos décadas, a raíz del brote que se produjo en Nueva Escocia en 1981 por el consumo de ensalada de repollo, identificándose la contaminación de la hortaliza con estiércol de oveja (Schlech y col., 1983). Es una enfermedad grave que cursa con meningitis, meningocelalitis, septicemia y abortos, con una mortalidad del 20 – 30% (McLauchlin, 1996, 1997; Rocourt, 1996).

El género *Listeria* consta de 6 especies, de las cuales sólo se considera patógena para los humanos, *L. monocytogenes* aunque *L. ivanovii* es patógena también para ciertos animales, de acuerdo con su LD₅₀ en ratón (Swaminathan, 2001).

L. monocytogenes se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y resiste bastante bien las condiciones ambientales adversas, incluidas un bajo pH (hasta 4,4) y relativamente elevadas concentraciones de NaCl (10 – 12%). Es anaerobio facultativo y psicrotrofo. Puede multiplicarse entre 0 y 45°C, con unos valores *g* y fases de latencia de, respectivamente, 43, 6,6 y 1,1 horas y 151, 48 y 7,3 horas a 4, 10 y 37°C (Barbosa y col., 1994). Se puede encontrar en superficies húmedas de los equipos industriales, lo que, unido a su facultad de multiplicarse en refrigeración, refleja su presencia en frigoríficos y unidades de refrigeración (ICMSF, 1996). Puede multiplicarse entre valores del pH de 4,4 y 9,6 (Lou y Yousef, 1999). La a_w óptima de crecimiento es de 0,97 y la mínima de 0,90 - 0,93 (Miller,

1992; Farber y col., 1992) pero puede sobrevivir durante largos periodos a niveles de a_w del orden de 0,83 (Swaminathan, 2001). Estas circunstancias hacen que sea casi imposible conseguir un alimento fresco libre de *L. monocytogenes*. De hecho, se han asociado brotes de listeriosis a diversos alimentos. Entre ellos, quesos blandos (Azadian y col., 1989; Bannister, 1987; Linnan y col., 1988), leche pasteurizada contaminada post-proceso (Fleming y col., 1985), productos cárnicos (Goulet y col., 1993; Jacket y col., 1995), pescado crudo y marisco (Lennon y col., 1984; Riedo y col., 1994), paté (McLauchlin y col., 1991; Kittson, 1992), ensalada de repollo (Schlech y col., 1983) y de arroz (Salamina y col., 1996) y diferentes alimentos RTE (Kerr y col., 1988; Schwartz y col., 1988; Gilbert y col., 1989; Kaczmarek y Jones, 1989; Kerr y col., 1990). No obstante, la aplicación eficaz del sistema APPCC desde la granja al consumidor minimiza el riesgo de enfermedad alimentaria (ICMSF, 1996, 2002).

Los brotes de listeriosis que se han presentado y las investigaciones epidemiológicas han permitido deducir que los alimentos RTE son de alto riesgo para los individuos susceptibles. Muchos de estos alimentos se someten a un tratamiento térmico medio y, normalmente, todos ellos se manipulan extensamente antes de su envasado, pudiéndose contaminar en esta etapa (Kalchayanand y col., 2001). El producto final, se conserva habitualmente bajo refrigeración, ofreciendo una gran oportunidad a *L. monocytogenes* para su multiplicación durante su almacenamiento en la industria, transporte y distribución, exposición en supermercados y, finalmente, en los frigoríficos domésticos. Entre los productos de esta naturaleza están los preparados con leche sin pasteurizar, quesos blandos, etc. y entre los derivados cárnicos, salchichas frankfurt y similares, pastelitos, empanadas, canapés, etc. que contienen carne e ingredientes de origen marino. Estas circunstancias han llevado a algunos países, como Canadá, a que estos alimentos se incluyan como productos de inspección obligatoria, dándole prioridad a los que han originado brotes de listeriosis o a aquellos de vida útil superior a 10 días (Farber, 2000).

En relación con la carne y productos cárnicos, cabe decir que diversos productos RTE cocidos preparados con carne de aves y mamíferos han sido la causa de diversos brotes de listeriosis en Norte América y Europa (Swaminathan, 2001), siendo el caso más grave el ocurrido en Francia en 1992 por el consumo de lengua de cerdo en gelatina en el que se vieron afectadas 279 personas con 85 muertes (Jacket y col., 1995). En EEUU se ha identificado como un factor de riesgo para la presentación de listeriosis alimentaria a frankfurters consumidas sin calentar y a la carne de pollo calentada insuficientemente durante el cocinado (Schwartz y col., 1989). La potencial multiplicación de *L. monocytogenes* en la carne depende del tipo de carne (en la de aves crece mejor que en otras), del pH de la misma y el tipo de población bacteriana de la microbiota competitiva. La contaminación del músculo puede producirse por portadores sintomáticos o asintomáticos a partir del animal después del sacrificio.

L. monocytogenes no se multiplica normalmente durante la fermentación de los embutidos pero con frecuencia se detectan células viables en tasas muy bajas algunas semanas después de que ha finalizado el proceso fermentativo (Truessel y Jemmi, 1989).

Aunque *L. monocytogenes* presenta, entre las bacterias vegetativas, una considerable termorresistencia, no es tan elevada como la de *M. tuberculosis* y, por tanto, se destruye con los tratamientos pasteurizantes aplicados a la leche (72 °C, 15 segundos) aunque se ha informado que en salami y

grasa aumenta su resistencia frente al calor (Fain y col., 1991). Se han ofrecido valores D a 52 °C y 70°C de 100 y 179 minutos y 0,13 y 0,11 minutos en pechuga y muslo de pollo, respectivamente (Mackey y col., 1989); a 54,4°C y 57,2°C de 20 y 6,6 – 9-8 minutos, respectivamente en embutidos fermentados (Schoeni y col., 1991); a 60 °C de 3,1 minutos en carne picada (Bradshaw y col., 1985); a 62 °C, 64°C, 66°C y 70°C de 2,2 – 2,5, 1,5 – 1,8, 0,68 – 0,95 y 0,16 – 0,20 minutos, respectivamente, en un homogeneizado de pollo (Gaze y col., 1989) e incluso, partiendo de una tasa de 2×10^5 células, se han detectado listerias en muslo de pollo tras un tratamiento a 82,2 °C después de un almacenamiento de 4 semanas bajo refrigeración (Carpenter y Harrison, 1989). Como se podría esperar, la presencia de solutos (a_w reducida) aumenta la termoresistencia (Summer y col., 1991; Miller, 1992) y el pH subóptimo para el crecimiento la disminuye (Beuchat y col., 1986).

La incidencia de *L. monocytogenes* en la carne fresca es muy elevada. Por ejemplo, se ha informado que en el Reino Unido el 60% de la carne de pollo vendida al detalle contiene *L. monocytogenes* (Pini y Gilbert, 1988; Petran y Swanson, 1993.) y en Irlanda se ha detectado *Listeria* spp. en el 97% de las más de un centenar de hamburguesas congeladas que se analizaron (Sheridan y col., 1994). En este mismo estudio se observó que no se detectaban listerias en las salchichas que se pre-ensararon y cocieron en la industria pero sí en el 21% del producto cocido que se vendía al detalle sin envasar tras el tratamiento térmico, lo que refleja una contaminación post-proceso. La incidencia en EEUU durante el periodo 1993 – 1996 fue de 0 – 2,2% en pastelitos de carne de vacuno; 1,0 - 5,3% en salchichas tipo frankfurt cocidas; 2,2 – 4,67% en salsas para untar y ensaladas y de 5,1 – 81% en jamón y fiambres cocido loncheados (Swaminathan, 2001). En un estudio realizado desde 1992 a 1995 en mataderos belgas y franceses, siempre se detectó *L. monocytogenes* (>1 u.f.c. 100 cm^{-2} o 25 g) en productos avícolas aunque el porcentaje fue reduciéndose en ese periodo desde el 32,1% en 1992 y 27,2% en 1993 hasta el 3,6% y 2,1% en 1994 y 1995, respectivamente (Uyttendaele y col., 1997). Además, en ese mismo estudio se observó que el 50% de las canales (de las aves) eran portadoras de listerias tras el escaldado. De forma similar, la incidencia de *L. monocytogenes* en alimentos cocidos RTE preparados con carne se ha reducido bastante en Canadá donde a partir de 1888 se estableció un plan de vigilancia, pasando del 24% en 1989 – 1990 hasta el 3% en 1991 – 1992 (Farber y Peterkin, 1999).

No se sabe cual es la dosis infectiva aunque ésta depende del estado inmunológico del hospedador. Los experimentos con humanos no pueden realizarse debido a la gravedad de la enfermedad y los estudios en ratas y otros animales de experimentación no son extrapolables al hombre. Sin embargo, los datos publicados indican que la población de *L. monocytogenes* en alimentos causantes de casos epidémicos y esporádicos de brotes es, habitualmente, superior a $100 \text{ u.f.c. g}^{-1}$ (SCVPH, 1999), entre 10^2 y 10^6 (ICMSF, 2002). Por ejemplo, en el que se produjo en Francia en 1992 por el consumo de lengua de cerdo en gelatina, el producto de envases sin abrir contenía una carga de listerias de 10^4 – 10^6 células g^{-1} (McLauchlin, 1996). No obstante, un brote que afectó a 4 individuos por el consumo de mejillones ahumados contenían $1,6 \times 10^7$ u.f.c. g^{-1} (Mitchell y col., 1991). En cualquier caso, no se puede confiar totalmente en los datos publicados porque el número de bacterias puede haber aumentado, o disminuido, entre el consumo y el análisis. En cualquier caso, la baja incidencia de listeriosis en los humanos (2 – 6 casos por millón de individuos –Mead y col., 1999-) sustenta la opinión de que la dosis infectiva es baja (Notermans y col., 1998; SCVPH, 1999).

Referencias

- Anónimo (1993) Cross-contamination/different strain in Oregon *E. coli* case. *Food Chem. News*, 35, 32 – 33.
- Ahmed, S. y Donaghy, M. (1998). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in central Scotland. En " *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains" Eds.: J. Kaper y O'Brien. ASM. Press. Washington D.C.
- Arnold, K. W. y Kaspar, C.W. (1995) Starvation and stationary phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2037 – 2039.
- Azadian, B. S., Finnerty, G. T. y Pearson, A. D. (1989). Cheese borne listeria meningitis in immunocompetent patient. *Lancet* i, 132 – 323.
- Barbosa, W. B., Cabedo, L., Wederquist, H. J., Sofos, J. N. y Schmidt, G. R. (1994). Growth variation among species and strains of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 57, 765 – 769.
- Beuchat, L. R., Brackett, R.E., Hao, D. Y. Y. y Conner, D. E. (1986) Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. *Can. J. Microbiol.*, 32, 791 – 795.
- Bradshaw, J. G., Peeler, J. T., Corwin, J. J., Hunt, J. M., Tierney, J. T., Larkin, E. P. y Twedt, R. M. (1985) Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *J. Food Prot.*, 48, 743 - 745
- Broughall, J. M. y Brown, C. (1984). Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development and application of three dimensional models to predict bacterial growth. *Food Microbiol.*, 1, 13 – 22.
- Carpenter, S.L. y Harrison, M.A. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* on processed poultry. *J. Food Sci.*, 54, 556 – 557.
- CDCP (Centers for Diseases Control and Prevention) (1994). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry cured salami in Washington and California 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 44, 157 – 160.
- CDCP (Centers for Diseases Control and Prevention) (2000). *Preliminary FoodNet data on the incidence of food-borne illness-selected sites, United States, 1999. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49, 2001 – 2005.
- Chapman, P.A. (2000) Sources of *Escherichia coli* O157 and experiences over the 15 years in Sheffield, UK. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement*, 88, 515 – 605.
- Chevillat, A. M., Arnold, K. W., Buchreiser, C. y Kaspar, C. W. (1995). *RpoS* regulation of acid, heat, salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1822 – 1824.
- Doyle, M. P. y Schoeni, J. L. (1984). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated to hemorrhagic colitis. *Applied Environ. Microbiol.*, 48, 855 – 856.
- Doyle, M. P. y Padhye, V. V. (1989). *Escherichia coli*. En " *Foodborne bacterial pathogens*" Ed. M. P. Marcel Dekker. New York.
- Everson, M. L., Hinds, M. W., Bernstein, R. S. y Bergdoll, M. S. (1988). Estimation of human doses of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* 7, 311- 316.
- Fain, A. R., Line, J. E., Moran, A. B., Martin, L. M., Lechowich, R. V., Carosella, J. M. y Brown, W. L. (1991) Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D-value and z- value determinations in ground beef and turkey. *J. Food Prot.*, 54, 756 – 761.
- Farber, J. M. (2000). Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood products. *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 247 – 251.
- Farber, J. M., Coates, F. y Daley, E. (1992). Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 103 –105.
- Farber, J. M. y Peterkin, P. I. (1999). Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. En: " *Listeria, listeriosis and food safety*". 2ª ed. Eds. E. T. Ryser y E. H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, L., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V. y Reingold, A. L. (1985). Pasteurized milk as vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Engl. J. Med.* 312, 404 – 407.

- FSIS (Food Safety and Inspection Service) (1993) Report on the *E. coli* O157:H7 outbreak in the Western State. May 21, 1993. Food Safety and Inspection Service, USDA.
- FSIS (Food Safety and Inspection Service) (2002) Draft risk assessment of the public health impact of on the *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef.
<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/00-023N/00-023NReport.pdf>
- Gaze, J. E., Brown, G. D., Gaskell, D. R. y Banks, J. G. (1989). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in homogenate of chicken, beef steak and carrot. *Food Microbiol.*, 6, 251 – 259.
- Genigeorgis, S. C., Riemann, H. y Sadler, W.W. (1967). Production of enterotoxin B in cured meats. *J. Food Sci.*, 34, 62 - 68.
- Gilbert, R. J., Mileer, K. L. y Roberts, D. (1989). *Listeria monocytogenes* and chilled foods. *Lancet* i, 383 – 384.
- Goodfellow, S.J. y Brown, W.L. (1978) Fate of *Salmonella* inoculated into beef for cooking. *J. Food Prot.* 41, 598 – 605.
- Goulet, V., Lepoutre, A. y Rocourt, J., Courtieu, A. L., Dehaumont, P. and Veit, P. (1993). Epidémie de listériose en France: Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. *Bull. Epidem. Hebdomadaire* 4, 13 – 14.
- Griffin, P. M. (1995). *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. En: "Infection of gastrointestinal tract" Raven Press. New York.
- Holmberg, S. D. y Blake, P. A. (1984). Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and olds misconceptions. *J. Amer. Med. Assoc.* 251, 487 – 489.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (1996). Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. 299 – 333. Chapman & Hall. London.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (2002). Microorganisms in foods 7. Microbiological testing in food safety management 313 – 332. Kluwe Academic Plenum Publishers & Hall. New York.
- Jablonski, L. M. y Bohach, G. A. (2001). *Staphylococcus aureus*. En: "Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers" 2ªed. Eds. M.P. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville. ASM Press. Washington D.C.
- Jacket, C., Catimel, B., Brosch, R., Buchrieser, C., Dehaumont, P., Goulet, V., Lepoutre, V. y Rocourt, J. (1995). Investigation related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2242 – 2246.
- Kaczmarek, E. B. y Jones, D. M. (1989). Listeriosis and ready-cooked chicken. *Lancet* i, 549.
- Kaddu-Mulindwa, D., Aisu, T., Gleier, K., Zimmermann, S. y Veutin, L. (2001). Occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faecal samples from children with diarrhoea and from healthy zebu cattle in Uganda. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 95- 101.
- Kalchayanand, N., Ray, B., Sikes, T. y Dunne, C.P. (2001). Complete destruction of *Listeria monocytogenes* in hot dogs by hydrostatic pressure and bacteriocin-based biopreservatives. University of Wyoming Annual Science Research Report 2001.
- Kerr, K. G., Dealler, S. F., y Lacey, R. W. (1988). *Listeria* ion cook-chill foods. *Lancet*, 332, 37 – 38.
- Kerr, K. G., Rotowa, N. A., Hawkey, P. M. y Lacey, R. W. (1990). Incidence of *Listeria* spp. in precooked chilled products by determined by culture and enzyme-linked immunoassay (ELISA). *J. Food Prot.*, 53, 606 – 607.
- Kittson, E. (1992). A case cluster of listeriosis in Western Australia with links to paté consumption. Procc. 11th Intern Symp. "Problem of listeriosis" 39 – 40. Copenhagen.
- Kudva, I. T., Hatfield, P. G. y Hovde, C. J. (1996). *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora dof sheep. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 431 – 433.
- Lennon, D., Lewis, B., Mantell, C. (1984). Epidemic perinatal listeriosis. *Ped. Infec. Dis.*, 3, 30 – 34.
- Leyer, G. J., Wang, L. L. y Johnson, E.A. (1995). Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3752 – 3755.
- Lin, J., Smith, M., Chapin, K., Baie, H., Bennet, G. y Foster, J. (1996) Mechanism of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3094 – 3100.

- Line, J., Fain, A., Moran, A., Martin, L., Lechowich, R., Carosella, J. y Brown, W. (1991). Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-values and z-values determination in ground beef. *J. Food Prot.* 54, 762 – 766.
- Linnan, M., Mascola, L., Low, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D., Yonekura, L., Hayes, P., Weaver, R., Andurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L. Kleks, A. y Broome, C. V. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New Engl. J. Med.*, 319, 823 – 828.
- Lou, Y. y Yousef, A. E. (1999) Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. En: "Listeria, listeriosis and food safety". 2ª ed. Eds. E.T Ryser y E.H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Mackey, B. M., Pritchett, C., Norris, A. and Mead, G. C. (1989). Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. *Lett. Appl. Microbiol.*, 10, 251 – 255.
- McLauchlin, J. (1996). The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, 7, 187 – 193.
- McLauchlin, J. (1997). The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective. *Med. Microbiol.*, 8, 1 - 14.
- McLauchlin, J., Hall, S. M., Velami, S. K. y Gilbert, R. J. (1991). Human listeriosis and paté: a possible association. *Br. Med. J.*, 303, 773 – 775.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1999) Food related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607 – 625.
- Meng, J., Doyle, M., Zhao, T. y Zhao, S. (2001). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. En: "Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers" 2ªed. Eds. M. P. Doyle, L. R. Beuchat y T. J. Montville. ASM Press. Washington D.C.
- Michino, H., Araki, K., Minami, S., Nakayama, T., Ejima, Y., Hiroe, K., Tanaka, H., Fujita, N., Usami, S., Yonekawa, M., Sadamoto, K., Tayaka, S. y Sakai, N. (1998). Recent outbreak of infectiousns caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. En " *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains" Eds.: J. Kaper y O'Brien. ASM. Press. Washington D.C.
- Miller, A. J. (1992). Combined water activity and solutes effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.*, 55, 414 – 418.
- Mitchell, D. L., Misrachi, A., Watson, A. J. y Coleman, D. (1991) A case cluster of listeriosis in Tasmania. Listeria in smoked mussels in Tasmania. *Comm. Dis. Intell.* 15, 427.
- Murray, E. G. D., Webb, R. A. y Swarn, M. B. R. (1926). A disease in rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.*, 29, 407 - 439.
- Nauta, M., Evers, E., Takumi, K. y Havelaar, A. (2001) Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 in steak tartare in the Netherlands. Report 25781003/2001. ROVM. Bilthoven. The Netherlands.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P. y Chackraborty, T. (1998). Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 61, 244 – 248.
- Petran, R. L. y Swanson, K. M. J. (1993). Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *J. Food Prot.*, 56, 616 – 618.
- Pini, P. N. y Gilbert, R. J. (1988). The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chicken and soft cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, 6, 317 – 326.
- Rocourt, J. (1999). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. En: "Listeria, listeriosis and food safety". 2ª ed. Eds. E. T. Ryser y E. H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Roberts, D. (1982). Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970 – 79. *J. Hyg.*, (Cambridge) 89, 491-498.
- Salamina, G., Dalle Donne, E., Niccolini, A., Poda, G., Cesaroni, D., Bucci, M., Fini, R., Maldini, M., Schuchat, A., Swaminthan, B., Bibb, W., Rocourt, J., Binkin, N. y Salmasso, S. (1996). A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiol. Infect.*, 117, 429 – 436.
- Schlech, W. F., Lavinge, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E.,

- King, S. H., Nicholls, E. S. y Broome, C. V. (1983). Epidemic listeriosis. Evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.*, 308, 203 – 206.
- Schoeni, J. L., Brunner, K. G. y Doyle, M. P. (1991). Rates of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beef and fermented beaker sausage. *J. Food. Prot.*, 54, 334 – 337.
- Schwartz, B., Broome, C.V., Brown, G. R., Hightower, A. W., Ciesielski, C. A., Gaventa, S., Gellin, B. C. y Mascola, L. (1988). Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. *Lancet* 2, 779 – 782.
- Schwartz, B., Hexter, D., Broome, C., Brown, G.R., Hightower, A., Hirschorn, R., Porter, J., Hayes, P., Bibb, W., Lorber, B y Faris, D. (1989) Investigation of an outbreak of listeriosis: new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. *J. Infect. Dis.*, 159, 680 – 685.
- SCVPH (Scientific committee on veterinary measures relating to public health) (1999) Opinion on *Listeria monocytogenes*. Adopted on 23 September 1999.
- SCVPH (Scientific committee on veterinary measures relating to public health) (2003) Opinion on verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 (VTEC) in foodstuffs. Adopted on 21 – 22 January 2003.
- Sheridan, J. J., Duffy, G., McDowell, D. A. y Blair, I. S. (1994). The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products. *Int. J. Food Microbiol.*, 22, 105 – 113.
- Summer, S. S., Sandros, T. M., Harmon, M. C., Scott, V. N. y Bernard, D. T. (1991) Heat resistance of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *J. Food Sci.*, 56, 1741 – 1743.
- Swaminathan, B (2001). *Listeria monocytogenes*. En: "Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers" 2^{ed}. Eds. M. P. Doyle, L. R. Beuchat y T. J. Montville. ASM Press. Washington D.C.
- Truessel, M. y Jemmi, T. (1989). Der verhalten von *Listeria monocytogenes* waehrend der reifung und lagerung von kuenstlich kontaminierter salami und mettwurst. *Fleischwirtschaft* 69, 1586 – 1592.
- Tsai, S. y Chou, C. (1996) Injury, inhibition and inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by potassium sorbate and sodium nitrite as affected by pH and temperature. *J. Sci. Food Agric.*, 71, 10 – 12.
- Uyttendaele, M. R., Neyts, K. D., Lips, R. M. y Debevere, J. M. (1997). Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products obtained from Belgian and French abattoirs. *Food Microbiol.*, 14, 339 – 345.
- Wells, J. G., Davis, B. R., Wachsmuth, I. K., Riley, I. W., Remis, R. S., Sokolow, R. y Morris, G. K. (1983). Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.*, 18, 512 – 520.
- Wilson, J. B., Clarke, R. C., Renwick, S. A., Rahn, K., Johnson, R. P., Karmali, M. A., Lior, H., Alves, D., Gyles, C. L., Sandhu, S., McEwen, S. A. y Spika, J. S. (1996) Vero cytotoxicogenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *J. Infect. Dis.*, 174, 1021- 1027.
- Zhao, T. y Doyle, M. (1994). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *J. Food Prot.*, 57, 780 – 783.
- Zhao, T., Doyle, M., y Besser (1993). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservative. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2526 - 2530.
- Zhao, T., Doyle, M. P., Shere, J. y Garber, L. (1995). Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in survey of dairy herd. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1290 – 1293.