

Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión en relación con la utilización del sistema CATALIX® (basado en la activación del sistema lactoperoxidasa) como tratamiento higienizante de frutas y hortalizas para su comercialización como productos de IV gama

Núm. Referencia: AESA-2005-012

Documento aprobado por el Comité Científico en sesión plenaria el 16 de noviembre de 2005

Miembros del Comité Científico

Arturo Anadon Navarro, Juan Antonio Ordóñez Pereda, Margarita Arboix Arzo, Juan José Badiola Díez, Andrés Otero Carballeira, Albert Bosch Navarro, Andreu Palou Oliver, Juan Francisco Cacho Palomar, Fernando Rodríguez Artalejo, Francesc Centrich Escarpener, Elías Rodríguez Ferri, José Manuel Sánchez-Vizcaino Rodríguez, José Luis García López, María Luisa García López, Manuela Juárez Iglesias, Vicente Sanchís Almenar, Gregorio Varela Moreiras, Manuel Martín Esteban, Gonzalo Zurera Cosano

Grupo de Trabajo

Juan A. Ordóñez Pereda (coordinador)
Andrés Otero Carballeira
Manuel Núñez Gutiérrez (experto externo)
Jesús Campos Amado (secretario)

Resumen

El sistema lactoperoxidasa tiocianato (LP) comprende una serie de reacciones que se producen de forma natural en diversos fluidos orgánicos (saliva, leche, lágrimas, etc). Se cree que su función es proteger al organismo frente a diversos microorganismos patógenos. Para que funcione el sistema se requiere la presencia de peroxidasa, tiocianato (SCN^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La enzima, en presencia de H_2O_2 , cataliza la oxidación de SCN^- originando diversos productos con actividad antimicrobiana, entre los cuales el hipotiocianito (OSCN^-) es el que se forma en mayores cantidades. Se considera que la actividad antimicrobiana de los compuestos formados radica en la oxidación de grupos sulfhidrilos de diversas enzimas y otras proteínas microbianas, aunque también pueden oxidar el NADH y NADPH perturbando los sistemas de transporte de energía y aminoácidos o la actividad de las enzimas glicolíticas. La eficacia del sistema LP puede variar dependiendo de diversos agentes y factores pero, en general, puede decirse que tiene una acción bacteriostática y/o bactericida sobre bacterias Gram negativas catalasa positivas. Las bacterias Gram positivas son más resistentes, considerándose que sólo inhibe su crecimiento.

El sistema CATALIX® es un reactor diseñado para imitar las reacciones que tienen lugar de forma natural con el sistema LP. Consta de dos recipientes donde se deposita H_2O_2 y SCN^- disueltos en agua que se hace pasar a través de un soporte donde está inmovilizada la lactoperoxidasa. De esta forma se activa el sistema y se generan las sustancias antimicrobianas. Los experimentos realizados utilizando lechuga como modelo parecen indicar que el sistema CATALIX® supera algo en eficacia a la cloración (100 mg/l) en la destrucción/inhibición de las bacterias que habitualmente se encuentran en las hortalizas frescas.

De entre las bacterias de interés sanitario que puede contaminar las hortalizas, *Listeria monocytogenes* es la que adquiere mayor relevancia por ser Gram positiva y por su psicrofilia. Es, pues, esta bacteria el microorganismos "diana" en relación con el tratamiento de hortalizas de IV gama con el sistema LP (CATALLIX®).

Se ha considerado que las hortalizas de IV gama se almacenan hasta su venta (no más de una semana) a temperatura de refrigeración (4°C), que la contaminación por *L. monocytogenes* durante el troceado de las hortalizas y otras manipulaciones supera las 10 células/g, que el valor g de esta bacteria en hortalizas refrigeradas es, en el peor de los casos, de 19 horas y que el objetivo de seguridad alimentaria (FSO) es de 100 u.f.c./g. En estas condiciones, se necesitaría un tratamiento de descontaminación que lograra una disminución de dos unidades logarítmicas para conseguir el FSO.

Ante la previsible prohibición por la UE del uso de hipoclorito sódico en los alimentos, se necesitan métodos alternativos para descontaminar las frutas y hortalizas de IV gama. El sistema CATALIX® posee un poder antibacteriano al menos igual a la cloración, por lo que se considera que puede utilizarse para el fin anteriormente mencionado. Por otra parte, las cantidades residuales de SCN⁻ en las hortalizas tratadas no presentan riesgo potencial para el consumidor, ya que la concentración detectada en estos productos está por debajo de los niveles endógenos descritos en saliva humana y en leche de vaca, oveja y cabra.

Palabras Clave

Lactoperoxidasa, hortalizas, frutas, *Listeria monocytogenes*, seguridad alimentaria.

1. El sistema lactoperoxidasa (LP)**1.1. Características de los componentes del sistema**

El sistema lactoperoxidasa-tiocianato o, simplemente, sistema lactoperoxidasa (LP), comprende una serie de reacciones que se producen de forma natural en diversos fluidos de los mamíferos, como la saliva y la leche. Se cree que su función es proteger al organismo frente a la acción de diversos microorganismos patógenos y/o un modo de seleccionar determinados microorganismos en el tracto intestinal de los recién nacidos (Davidson, 2001). Este sistema es uno de los agentes antimicrobianos presentes naturalmente en el organismo. En la leche de vaca es donde se ha estudiado más extensamente, estando en la actualidad bastante bien documentado.

Para que el sistema funcione se requiere la presencia de tres componentes: la enzima lactoperoxidasa (LP), tiocianato (SCN^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La lactoperoxidasa (EC 1.11.1.7) es una enzima de la familia química de las peroxidases que están ampliamente distribuidas en la naturaleza tanto en los animales, incluidos los humanos, como en los vegetales. Su función principal es la de catalizar la oxidación de diversos componentes en presencia de peróxido de hidrógeno (Reiter y Härnulf, 1984). Las peroxidases se encuentran en las glándulas mamarias, salivares y lacrimales de los mamíferos y en sus respectivas secreciones, es decir, en leche, saliva y lágrimas. En estos fluidos se hallan en forma soluble pero en los tejidos glandulares pueden estar ligadas a partículas subcelulares (Hogg y Jago, 1970), lo que puede afectar a su afinidad por diferentes sustratos donadores de electrones (Kussendrager y Hooijdonk, 2000). Todas ellas son química e inmunológicamente similares. Son glicoproteínas con un grupo hemo en el centro catalítico covalentemente ligado a una cadena polipeptídica mediante un puente disulfuro (Thanabal y La Mar, 1989). La LP se encuentra naturalmente presente en las leches de vaca, oveja, cabra y búfala, con contenidos respectivos de 1,2 – 19,4 (Björck y col., 1975; Reiter y col., 1976; Reiter y Härnulf, 1984), 0,14 – 2,38 (Medina y col., 1989), 0,95 – 2,15 (Zapico y col., 1991) y 0,9 (Härnulf y Kandasamy, 1982) unidades/ml. Existe también en leche humana pero su concentración es unas 20 veces más baja que la de la leche de vaca (Gothefors y Marklund, 1975).

En cuanto a su estabilidad en relación con su actividad en el sistema LP cabe mencionar que, a concentraciones de 25 mg/l, es bastante estable a valores del pH superiores a 4 (Kussendrager y Hooijdonk, 2000) y pierde actividad a medida que el pH desciende de este valor (Paul y Ohlsson, 1985; Witt y van Hooijdonk, 1996). La lactoperoxidasa es muy fotolábil en presencia de riboflavina, habiéndose estimado que tras una exposición a 6000 lux durante 4 horas a 10°C se desactiva el 55% en leche y el 75% en suero y, por el contrario, no pierde actividad en tampón a pH 6,7 si no se añade riboflavina (Hernández y col., 1990). La lactoperoxidasa tiene una gran tendencia a adherirse a las superficies, lo que puede ocasionar que las disoluciones diluidas de la enzima disminuyan su actividad marcadamente (Kussendrager y Hooijdonk, 2000). Aunque se desconoce la razón de este comportamiento se ha sugerido que puede derivar del hecho de que la molécula puede interactuar tanto iónica como hidrofólicamente (Paul y Ohlsson, 1985).

El tiocianato es una sustancia ubicua en órganos (riñón, estómago, etc.), fluidos (sinovial, espinal, linfa, plasma, etc.) y secreciones (leche, saliva, etc.) de mamíferos (Wolfson y Sumner, 1993;

Kussendrager y Hooijdonk, 2000). Sus concentraciones dependen parcialmente de la alimentación y, en el caso particular del hombre, del hábito de fumar (Kussendrager y Hooijdonk, 2000). Se han descrito, por ejemplo, concentraciones de 37 – 198 mg/l en la saliva de hombres adultos y de 15 – 22 mg/l en la de jóvenes (Reiter y Härnulf, 1984; Reiter y Perraudin, 1991). En el caso particular de la leche, las concentraciones halladas son muy variables, estando comprendidas en los intervalos de 1,2 – 15,1 mg/l para la leche de vaca (Klebanoff y col., 1966), 0,4 – 20,6 mg/l para la de oveja con un valor medio de 10,3 mg/l (Medina y col., 1989) y en la leche de cabra se han registrado valores medios de 5,76 y 3,20 mg/l para las razas verata y murciano granadina, respectivamente (Zapico y col., 1991). La fuente de los tiocianatos son los glucosinolatos y los glucósidos cianógenos. Los primeros se encuentran en las hortalizas del género Brassica, como repollo, coles de Bruselas, coliflores, etc.; durante su hidrólisis se forma tiocianato entre otros productos, como isotiocianato y nitrilos (Reiter y Härnulf, 1984). Los glucósidos cianógenos se han descrito en repollo, patata, maíz, guisantes, etc.; cuando se hidrolizan se originan cianuros cuya acción tóxica se neutraliza al reaccionar con sustancias resultantes del metabolismo de los aminoácidos azufrados, los tiosulfatos, generándose tiocianato como producto final (Reiter y Härnulf, 1984).

El peróxido de hidrógeno es el tercer componente del sistema LP. El H_2O_2 puede formarse endógenamente en numerosas reacciones, como aquellas en las que están implicadas xantina oxidasa, glucosa oxidasa o sulfhidril oxidasa, pero normalmente el peróxido se neutraliza rápidamente merced a diversas enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa) presentes en el medio, por lo que no llega a alcanzar cantidades mensurables en la leche (Wilkins y Board, 1989). Bajo condiciones aeróbicas muchos lactobacilos, lactococos y estreptococos pueden producir cantidades suficientes de H_2O_2 como para activar el sistema LP (Kussendrager y Hooijdonk, 2000), necesitándose para ello cantidades de 8 a 10 mg/l (Davidson, 2001). El peróxido de hidrógeno, no obstante, puede tener una procedencia exógena, pudiéndose añadir como tal, en forma ligada (p.ej. percarbonato sódico, peróxido de magnesio) o mediante el uso de sistemas que generen H_2O_2 en continuo, como p.ej. xantina oxidasa o glucosa oxidasa inmovilizadas (Kussendrager y Hooijdonk, 2000). Incluso se ha observado que una práctica de este tipo es más eficaz para el funcionamiento del sistema LP que la adición directa de peróxido de hidrógeno (Klebanoff y col., 1966).

1.2. Mecanismo de acción del sistema LP

La LP cataliza la oxidación del tiocianato y algunos haluros. En estas reacciones se generan a partir del SCN^- compuestos intermediarios transitorios resultantes de la oxidación del mismo que pueden después sufrir oxidaciones adicionales para formar productos finales, como sulfato, dióxido de carbono y amoníaco o también pueden reciclarse para generar de nuevo SCN^- (Reiter y Härnulf, 1984). Estos productos intermediarios son los que poseen actividad antimicrobiana. El metabolito principal es el hipotiocianato ($OSCN^-$) y es éste el que se forma en mayores cantidades (Aune y Thomas, 1977; Klebanoff y col., 1966; Reiter y Härnulf, 1984; Wolfson y Sumner, 1993). El $OSCN^-$ puede producirse por dos diferentes rutas (Wolfson y Sumner, 1993; Wilkins y Board, 1989; Kussendrager y Hooijdonk, 2000):

- La oxidación de SCN^- , catalizada por la LP, puede dar lugar a tiocianógeno $[(SCN)_2]$ que rápidamente se hidroliza generando ácido hipotiocianoso (HOSCN) en equilibrio ácido-base con el $OSCN^-$

($pK = 5,3$). A este valor del pH existen cantidades equimolares de los dos compuestos. Ambos tienen actividad antimicrobiana pero las evidencias muestran que la del no cargado (HOSCN) es mayor que la del disociado (Kussendrager y Hooijdonk, 2000).

- $2 \text{SCN}^- + \text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \longrightarrow (\text{SCN})_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
 $(\text{SCN})_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{HOSCN} + \text{SCN}^- + \text{H}_2\text{O}$
 $\text{HOSCN} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{OSCN}^- \quad (pK = 5,3)$
- En la otra vía, el SCN^- puede oxidarse directamente a OSCN^-
 $\text{SCN}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{OSCN}^- + \text{H}_2\text{O}$

Se considera que la actividad antimicrobiana clave del sistema LP radica en la oxidación de los grupos sulfhidrilos de diversas enzimas y otras proteínas microbianas, formándose puentes disulfuro, sulfeniltiocianatos o ácidos sulfénicos (Thomas, 1985; Reiter y Härnulf, 1984), lo que se traduce en la inhibición del crecimiento, de la entrada de oxígeno en las células y de la producción de ácido láctico. El OSCN^- puede también oxidar el NADH y NADPH a NAD^+ y NADP^+ (Hoogendoorn, 1977), perturbando los sistemas de transporte de energía y aminoácidos o la actividad de las enzimas glicolíticas (Reiter y Härnulf, 1984), lo que puede explicar también su actividad bacteriostática o bactericida.

Se considera que la activación del sistema LP requiere de 10 a 12 mg/litro de tiocianato y de 8 a 10 mg/litro de peróxido de hidrógeno (Wilkins y Board, 1989).

1.3. Actividad antimicrobiana

De acuerdo con las múltiples moléculas que pueden verse afectadas por la acción oxidante del sistema LP, la actividad antimicrobiana global del mismo puede ocasionar lesiones o modificaciones en diversas estructuras (pared celular, membrana citoplasmática, sistema de transporte, enzimas glicolíticas, ácidos nucleicos) de la célula microbiana y, en consecuencia, ocasionar la muerte o la inhibición del crecimiento o del metabolismo de los microorganismos afectados.

La eficacia del sistema LP puede variar dependiendo de numerosos factores. Entre ellos, la presencia de componentes de bajo peso molecular en el medio (Hoogendoorn y col., 1977), la cantidad de H_2O_2 disponible y la forma de suministrarla (Reiter y Härnulf, 1984), la fase de crecimiento del microorganismo (Purdy y col., 1983), el crecimiento en aerobiosis o anaerobiosis (Carlsson y col., 1984), etc.

Por otra parte, cabe la posibilidad de que algunos microorganismos puedan neutralizar los productos de oxidación del sistema LP mediante la reducción de los derivados sulfenil para transformarlos de nuevo en restos sulfhidril o, alternativamente, metabolizando los restos sulfenil generando nuevos componentes (Aune y Thomas, 1977; Reiter y Härnulf, 1984).

A pesar de esta variabilidad en la eficacia antimicrobiana del sistema LP, pueden hacerse una serie de consideraciones generales. Tiene una acción no sólo inhibidora sino también bactericida (dependiendo de las condiciones del medio) sobre las bacterias Gram negativas catalasa positivas como coliformes, pseudomonas, salmonelas, shigelas, etc. que incluso, eventualmente, pueden ser lisadas (Björck, 1978; Wilkins y Board, 1989; Kussendrager y Hooijdonk, 2000). Las bacterias Gram positivas, incluidos *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, son más resistentes; se considera que sólo

inhibe el crecimiento de las mismas (Björck, 1978; Wilkins y Board, 1989; Kussendrager y Hooijdonk, 2000) aunque las investigaciones con *L. monocytogenes* han dado lugar a resultados contradictorios (véase apartado *Estimación del riesgo por tiocianato*). Las diferencias en la sensibilidad de unas y otras puede explicarse teniendo en cuenta la diferencia en la estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas y negativas y en sus distintas propiedades barrera (Reiter y Härnulf, 1984; Witt y van Hooijdonk, 1996). Se han observado también diferencias entre especies próximas de bacterias Gram positivas catalasa negativas. Por ejemplo, la actividad puede ser bactericida y bacteriostática sobre los patógenos *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*, respectivamente, mientras que las bacterias lácticas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* (antes adscritas al género *Streptococcus*) son resistentes. Dicha resistencia se debe a que los lactococos sintetizan una enzima (NADH : OSCN⁻ oxidoreductasa) que cataliza la oxidación del NADH₂ en presencia del metabolito intermediario OSCN⁻ (con actividad antimicrobiana) que se convierte en SCN⁻ (Carlsson y col., 1983).

Recientemente se ha propuesto el empleo del sistema LP para prevenir el desarrollo de diversos microorganismos responsables de enfermedades post-recolección en mangos: una bacteria Gram negativa *Xanthomonas campestris* y dos hongos, *Botryodiplodia theobromae* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Le Nguyen y col., 2005). El sistema LP inhibió completamente el desarrollo de los tres microorganismos y, en el caso de *Xanthomonas*, el efecto fue más eficaz a un pH de 5,5.

2. Fundamento del sistema CATALIX®

El sistema CATALIX® es un reactor diseñado para imitar las reacciones que naturalmente ocurren en la leche cuando opera el sistema L. P. Consta, en esencia, de dos recipientes donde se depositan los sustratos 1 (H₂O₂) y 2 (SCN⁻) disueltos en agua a la que se ha añadido el coagulante Wac HB® (ampliamente utilizado para el tratamiento de agua potable). El agua se hace pasar a través de un soporte de bentonita en el que se ha inmovilizado mediante enlace iónico la enzima LP (extraída de leche cruda). De esta forma se producen las reacciones anteriormente descritas, generándose los productos intermedios transitorios, principalmente OSCN⁻, responsables de la actividad antimicrobiana.

El sistema puede acoplarse fácilmente en una cadena de producción de diversos alimentos, como las frutas y hortalizas de la IV gama, a los que trata por aspersión con el "agua activada" con propiedades bacteriostáticas y biocidas.

3. Comparación de la eficacia del sistema CATALIX® frente a la cloración

A petición de industrias del Reino Unido implicadas en la venta y transformación de alimentos frescos, la *Campden and Chorleywood Research Association* hizo un estudio comparativo de la actividad antimicrobiana del cloro frente a la del sistema CATALIX® (Cleanroom Technology, 2005) utilizando lechuga iceberg (n = 3) inoculada con diversas bacterias. De forma resumida puede decirse (Cleanroom Technology, 2005) que el sistema CATALIX® fue algo más eficaz en la destrucción/inhibición de las bacterias que habitualmente se encuentran en las hortalizas frescas.

A modo de ejemplo, el número de *Salmonella sp.* (población inicial log u.f.c/g ~ 2,4) disminuyó tras el lavado 1,5 unidades logarítmicas/g con el tratamiento con CATALIX® y 1,3 unidades logarít-

micas con cloro (100 mg/l). A los tres días la reducción fue similar, próxima al 97%, alcanzándose una población en ambos casos de $\sim 0,8 \log \text{ u.f.c/g}$.

En el caso de *E. coli*, el lavado con cloro (100 mg/l) ocasionó una reducción del 96% (población inicial $\log \text{ u.f.c/g} = 3,64$) y con CATALLIX® del 92% (población inicial $\log \text{ u.f.c/g} = 5,34$). Después las bacterias dañadas/viables tratadas con cloro comenzaron a multiplicarse de tal forma que a los tres días la población llegó a un valor de $\log \text{ u.f.c./g} = 6,12$, es decir, una carga microbiana equivalente a 300 veces la inicial. Sin embargo, el número de bacterias tratadas con CATALLIX® alcanzó a los tres días un valor de $\log \text{ u.f.c./g} = 5,64$, es decir, que su número sólo se duplicó respecto a la población inicial.

Finalmente, *Listeria monocytogenes*, bacteria Gram positiva, fue más resistente que las otras dos bacterias (Gram negativas), alcanzándose reducciones del 90% tras el lavado con cloro (población inicial $\log \text{ u.f.c/g} = 2,73$) y del 65% tras el lavado con CATALLIX® (población inicial $\log \text{ u.f.c/g} = 2,83$). Después del lavado, las listerias tratadas con cloro empezaron a multiplicarse, al igual que ocurría en el caso de *Salmonella sp.* y *E. coli*, alcanzándose a los tres días de almacenamiento una población similar a la inicial (población final $\log \text{ u.f.c/g} = 2,78$). Sin embargo, las bacterias tratadas con CATALLIX® continuaron disminuyendo durante los tres días de almacenamiento, produciéndose una reducción adicional de 0,68 unidades logarítmicas/g, pudiéndose calcular una disminución global del orden del 93%. La respuesta de *L. monocytogenes* frente al sistema LP (CATALLIX®) se ha atribuido a que el OSCN⁻ ocasiona un daño en las células de que difícilmente pueden reparar, lo que no ocurre en el caso del tratamiento con cloro (Cleanroom Technology, 2005).

Cuestión y términos en que se plantea

La cuestión que se plantea es analizar, a la luz de los conocimientos actuales, si la aplicación del sistema LP es apropiado para sustituir el tratamiento con cloro de frutas y hortalizas de la IV gama y si de este modo se podría lograr, al menos, un nivel similar de protección al consumidor.

Evaluación del riesgo

1. Identificación del peligro

En primer lugar, conviene apuntar que la preparación de frutas y hortalizas de la IV gama conlleva una serie de operaciones que, por una parte, podrían originar la contaminación con microorganismos del entorno procedentes de los manipuladores o de contaminaciones cruzadas y, por otra, una de las operaciones implica en muchas ocasiones un troceado del producto fresco, lo que provoca una rotura de las paredes celulares del alimento y la exudación de fluidos que sirven de nutrientes a los microorganismos presentes, con una mayor accesibilidad que si el producto está íntegro. La contaminación permite a una gran diversidad de microorganismos alcanzar el producto y, dependiendo de las propiedades intrínsecas del alimento (puede citarse al pH como característica clave) y de las condiciones del almacenamiento (en particular de la temperatura) se seleccionará una determinada microbiota. Por regla general, admitiendo que el alimento ya preparado se almacena a temperaturas de refrigeración, lo más frecuente es que en las hortalizas con pH superior a 4,0 sean especies del género *Pseudomonas* las responsables de la alteración, por tener un tiempo de generación (valor g) más bajo

a temperaturas de refrigeración. En este supuesto, que es el más probable, la alteración no afectaría a la salud del consumidor pero sí a la vida útil del producto de IV gama. El tratamiento con el sistema LP (CATALLIX®) sería recomendable ya que las pseudomonas son Gram negativas y, por tanto, se encuentran entre las bacterias de elevada sensibilidad al OSCN⁻ (Davidson, 2001). Una investigación con *P. fluorescens* indica que el sistema LP provoca una reducción de 1,69 unidades logarítmicas/ml en leche a 4° C durante 24 horas y de 1,85 unidades a 8° C (Zapico y col., 1995).

Una gran variedad de bacterias patógenas pueden alcanzar el alimento mientras se prepara para su envasado y venta pero, quizás, las que pueden alcanzar mayor relevancia son las que pueden multiplicarse a temperaturas de refrigeración. Atendiendo a este atributo serían *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* y *L. monocytogenes* las bacterias patógenas a tener en cuenta. Las dos primeras son Gram negativas y caen, por tanto, dentro de las menos resistentes al sistema LP. Resta *L. monocytogenes*, que alcanza la mayor relevancia en relación con el tratamiento de frutas (excluidos los cítricos de pH muy bajo) y hortalizas de IV gama con el sistema LP (CATALLIX®).

2. Caracterización del peligro

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 grave. En su versión leve se manifiesta con fiebre, dolores musculares y a veces náuseas. La modalidad grave (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, convulsiones, meningitis, 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 existe un sector de la población, que se ha estimado en alrededor del 15% (Buchanan y col., 1997), especialmente susceptible. 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 grave de la enfermedad que en EE.UU. se estima que afecta anualmente a alrededor de 2.500 personas, de las cuales unas 500 fallecen (CDCP, 2003). En España, según datos recogidos en el *Boletín Epidemiológico Semanal*, en el año 2004, se declararon al Servicio de Información Microbiológica 100 aislamientos de *Listeria monocytogenes* procedentes de casos humanos (39 laboratorios declarantes).

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.). Los brotes de listeriosis que se han presentado y las investigaciones epidemiológicas han permitido deducir que los alimentos listos para su consumo (*ready to eat*), entre los que pueden incluirse las frutas y hortalizas de IV gama, son de alto riesgo para los individuos susceptibles. *L. monocytogenes* se adhiere fuertemente a las superficies y se multiplica fácilmente en los productos refrigerados (Farber y Peterkin, 1999; Glass y Doyle, 1989). La eliminación de las listerias, e incluso la reducción de su incidencia, son muy difíciles en los establecimientos que elaboran este tipo de productos, debido a que estas bacterias se alojan en zonas muy recónditas de los equipos, como juntas, válvulas, etc. donde

pueden persistir durante años y en cualquier momento pueden 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 indican que la población de *L. monocytogenes* en alimentos causantes de brotes y casos esporádicos de listeriosis se sitúa entre 102 y 106 u.f.c./g (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 a 3 (según Mead y col., 1999) ó de 5 a 6 (según los CDCP, 2000) casos anuales por millón de individuos. Estas circunstancias apoyan la opinión de que las infecciones se producen por dosis elevadas de *L. monocytogenes* (Notermans y col., 1998; SCVPH, 1999).

Sin embargo, la contaminación por *L. monocytogenes* de los alimentos en general constituye un riesgo importante para los consumidores, y en la propuesta de Reglamento de la Comisión Europea relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, se establece un criterio coherente con la consecución (en los alimentos destinados a la población en general) de un objetivo de inocuidad alimentaria de 100 u.f.c/g. Sus características, especialmente el ser psicrotrofa y Gram positiva, hacen que esta bacteria sea el microorganismo modelo para deducir la aptitud del sistema LP (CATALLIX®) como sustituto del tratamiento con cloro (en el procesado de frutas y hortalizas de la IV gama) manteniendo, al menos, un nivel similar de protección del consumidor.

Se remite al lector a una opinión previa de este Comité (AESA, 2005), en cuyo apéndice II se hacen consideraciones adicionales acerca de *L. monocytogenes*.

3. Respuesta de *L. monocytogenes* frente al sistema LP

L. monocytogenes es una bacteria Gram positiva y, por tanto, hay que encuadrarla entre las resistentes al OSCN⁻ generado en el sistema LP. La importancia de este microorganismo en relación con la seguridad alimentaria ha interesado a los investigadores y es bastante abundante la bibliografía acerca del tema. Los resultados de las investigaciones realizadas son, a veces, contradictorios. Unos autores han observado un efecto bactericida del sistema LP. Podrían citarse el trabajo de Denis y Ramet (1989) que observaron una completa eliminación de *L. monocytogenes* presente en la superficie de quesos blandos, el de Kamau y col. (1990) utilizando el sistema LP nativo de la leche, el de Zapico y col. (1993), quienes concluyeron que el sistema LP tiene un ligero efecto bactericida en leche de cabra, y el de Gaya y col. (1991) en el que se indica que el sistema LP exhibió actividad bactericida sobre cuatro cepas de *L. monocytogenes*, aunque la magnitud de la misma dependió, entre otros factores, de la cepa, hallándose un tiempo de reducción decimal a 4° C entre 4,1 y 11,2 días. Finalmente, El-Shenawy y col. (1990) observaron que la acción bactericida dependía de la densidad de la población y de la temperatura; la desactivación fue total en 12 – 24 horas a 4° C y en 2 – 4 horas a 35° C cuando las tasas eran bajas (30 - 50 u.f.c./ml) pero con concentraciones medias (104 u.f.c./ml) o elevadas (108 u.f.c./ml) el efecto bactericida fue limitado, con descenso de la población de 0,5 y 1 unidades logarítmicas/ml a 4° C y 35° C, respectivamente. Otros autores, sin embargo, han observado un efecto bacteriostático. Entre ellos, Earnshaw y Bank (1989) en leche UHT inoculada con la bacteria, Siragusa y Jonson (1989) que realizaron sus investigaciones con la cepa Scott A, y Bibi y Bachmann (1990) que utilizaron dos temperaturas en el estudio. Estos últimos autores observaron que el efecto

bacteriostático dependía de la temperatura, estimando una duración de más de 20 horas a 20°C y de más de 100 horas a 8 °C.

4. Estimación de la contaminación de las frutas y hortalizas con *Listeria monocytogenes*, de su evolución en los productos almacenados a refrigeración y del criterio de rendimiento del tratamiento de descontaminación de frutas y hortalizas

La vida útil de las frutas y hortalizas de IV gama tratadas con cloro (habitualmente 80 mg/l) no es muy larga, no más de una semana a temperaturas de refrigeración. Su alteración habitual corre a cargo de bacterias Gram negativas, sobre todo las del género *Pseudomonas*.

De forma general, las frutas que habitualmente se utilizan para su transformación en productos IV gama (manzana, naranja, pomelo, melocotón, etc.) tienen un pH inferior a 4,0 mientras que en las hortalizas (lechuga, espinaca, zanahoria, cebolla, etc.) el pH se sitúa en valores superiores a 5,0 a excepción del pepino (3,8) y el tomate (4,3) entre otros. Estas circunstancias implican que *L. monocytogenes* no puede, al igual que otras muchas bacterias patógenas, multiplicarse en las frutas frescas. No deben preocupar, pues, estos productos en relación con la seguridad alimentaria una vez tratados con un sistema higienizante, como la cloración. *L. monocytogenes* sí puede desarrollarse, en cambio, en las hortalizas.

Las hortalizas están generalmente libres de patógenos del hombre y animales a no ser que hayan sido expuestas por riego o fertilización a efluentes y otros residuos de origen humano o animal. En aquellos países/regiones en los que se utilizan estas prácticas cabe esperar la presencia de patógenos en el producto fresco. De hecho, se han descrito, por ejemplo, brotes de salmonelosis atribuidos al consumo de apio, lechuga, repollo, endibias, etc. contaminados (Geldreich y Bordner, 1971; Bryan, 1977). Asumiendo una producción hortofrutícola a gran escala donde se controlan tanto las prácticas agrícolas como la manipulación de los productos recolectados, la contaminación por patógenos es rara. No obstante, pueden contaminarse en etapas posteriores a la recolección durante su manipulación y procesado cuando, por ejemplo, se preparan productos de IV gama. Nunca puede asegurarse una ausencia total de patógenos. La contaminación en estas condiciones podría compararse a la que sufren otros alimentos procesados, como los cárnicos cocidos, cuando se reduce su tamaño (lonchas, rodajas, cubos, etc.) para elaborar porciones domésticas.

La propuesta de Reglamento de la Comisión Europea relativa a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios especifica, en relación con *L. monocytogenes*, que al final de la vida útil de dichos productos (si están destinados a la población general), el número ha de ser como máximo de 100 u.f.c./g. Así lo entiende también la ICMSF (2002).

Tomando una postura conservadora, la ICMSF (2002) estima que una contaminación por *L. monocytogenes* en operaciones posteriores a la cocción de productos cárnicos puede, en el peor de los casos, alcanzar la tasa de 10 u.f.c./g. Lo mismo podría ocurrir durante el troceado y manipulación de hortalizas para la preparación de productos de IV gama. En la evaluación realizada se ha considerado que:

1. Las hortalizas de IV gama se almacenan hasta su venta a temperaturas de refrigeración.

2. La vida útil de las hortalizas de IV gama es de una semana.
3. La contaminación por *L. monocytogenes* es, como máximo, de 10 u.f.c./g.
4. A partir de los datos recogidos en ComBase (2005) puede estimarse un valor g (tiempo de duplicación) medio de alrededor de 60 horas para el crecimiento de *L. monocytogenes* en hortalizas a temperaturas de refrigeración (5 – 7° C). No obstante, el valor g más bajo de los que figuran en dicha base de datos es de 19,3 horas a 7° C en brécol, que se va a elegir para simular “el peor caso” de los posibles.
5. El objetivo de seguridad alimentaria (FSO) a alcanzar es el de 100 u.f.c./g en el momento del consumo del producto

Para conseguir el FSO, se precisaría un tratamiento que ocasionara 1,6 reducciones decimales (1,6D) durante el proceso de fabricación, a fin de que la carga microbiana máxima tras el tratamiento fuera de 25 u.f.c. de *Listeria monocytogenes*/100 g. Este nivel permitiría que, incluso con las 8,7 duplicaciones estimadas para “el peor caso” antes indicado, la población de *L. monocytogenes* no superase el valor de 100 u.f.c./g de producto durante los siete días de vida útil del mismo.

En conclusión, en el caso de *L. monocytogenes*, el FSO para hortalizas de IV gama se conseguiría con tratamientos que ocasionaran una reducción de dos unidades logarítmicas (criterio de rendimiento del proceso de descontaminación = 2D).

5. Conclusión sobre la eficacia descontaminante del sistema lactoperoxidasa en frutas y hortalizas de la IV gama

Aunque se ha puesto en duda la eficacia del tratamiento con cloro (100–300 mg/l) para higienizar las hortalizas (Nichols y col., 1971) es el que actualmente se utiliza, ya que dada la inestabilidad del cloro en presencia de materia orgánica, las bajas dosis de cloro puedan hacer algo más que impedir la entrada de bacterias con el agua (ICMSF, 1980) aunque, evidentemente, el efecto depende de la concentración utilizada, del tiempo de permanencia, del pH y del número de lavados. El control continuo de los niveles de cloro es imperativo (ICMSF, 1980). La cloración no es, sin embargo, una panacea; su aplicación ha de ir unida al seguimiento de estrictas medidas higiénicas en los equipos y en las operaciones. Además, se requiere un control de las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa), ya que la supervivencia y la persistencia de coliformes y bacterias patógenas en la mayor parte de las hortalizas frescas están relacionadas con estos factores.

Ante la previsible prohibición del uso de hipoclorito sódico y cloro en los alimentos por la UE, se necesitan métodos alternativos a la cloración. Se ha sugerido la aplicación del sistema LP. En apartados anteriores se ha descrito detalladamente el fundamento de este método y la actividad antimicrobiana del mismo. A la vista de tales datos parece poder concluirse que el proceso CATALIX®, basado en la actividad del sistema LP, posee un poder antibacteriano, al menos, igual al de la cloración. Las publicaciones acerca de si su acción es bactericida o bacteriostática ofrecen unos datos confusos. Como han observado algunos autores (El-Shenawy y col. 1990), la acción es bactericida cuando el número de listerias es bajo, como es el caso de las hortalizas de IV gama. No obstante si, en el peor de los casos, se asume que es bacteriostática, el sistema sería también eficaz, ya que se ha supuesto una contaminación de 10 listerias por gramo de producto y, de acuerdo con Bibi y Bachmann (1990),

el efecto bacteriostático es superior a 100 horas (4 días) a 8° C. A 4° C, los siete días de vida útil del producto no serían suficientes para que la población de listerias alcanzara el valor del FSO.

Finalmente, otro dato que permite inclinarse a favor de la eficacia del tratamiento con el sistema CATALIX® radica en las investigaciones comparativas entre diversas bacterias patógenas, incluida *L. monocytogenes*, realizadas por Campden and Chorleywood Research Association (Cleanroom Technology, 2005) en relación con la eficacia del tratamiento con cloro y la aplicación del sistema LP mediante el proceso CATALIX®. Los resultados, como se ha comentado en el apartado E3, son siempre favorables al proceso CATALIX®.

No se dispone información acerca del efecto del sistema LP sobre los virus desnudos, que pueden contaminar frutas y hortalizas. Por ello, no puede evaluarse el riesgo asociado a estos microorganismos en alimentos tratados con el sistema CATALIX®.

Estimación del riesgo por tiocianato y su toxicidad

Los residuos de agua oxigenada tras el tratamiento con el sistema CATALIX® son imperceptibles y los de tiocianato muestran valores regulares del orden de 0,5 mg/kg de ensalada después del lavado final (AFSSA, 2003). Suponiendo un consumo de ensalada de 62 g/día, la exposición de iones tiocianato es de alrededor de 0,03 mg/día, un valor muy por debajo de la exposición normal a través de la saliva que puede alcanzar 25 mg/día (AFSSA, 2003), y de las cantidades descritas de 1 y 15 mg/l (Reiter y Härnultv, 1984), 6,98 – 12,06 mg/l (Medina y col., 1989) y 0,76 – 15,85 mg/l (Zapico y col., 1991) en leche de vaca, oveja y cabra, respectivamente. Adicionalmente, la naturaleza inocua del sistema LP viene apoyada por investigaciones *in vitro* con cultivo de células animales cuyos resultados no han mostrado efecto tóxico alguno (Reiter y Härnultv, 1984).

Puede concluirse que el sistema LP aplicado con el proceso CATALIX® no parece dejar residuos tóxicos que puedan afectar a la salud del consumidor.

Situación en otros países

El sistema CATALIX® está autorizado en Finlandia (Ministerio de Comercio y de Industria) y ha sido evaluado por la Agencia Francesa para la Seguridad Sanitaria de los Alimentos, que ha emitido un dictamen positivo para su uso en el lavado de vegetales de IV gama (AFSSA, 2003). El sistema LP está aconsejado por la FAO para el tratamiento de la leche cruda en aquellos países en los que es difícil el uso de sistemas de refrigeración, de acuerdo con las directrices establecidas por la Comisión del *Codex Alimentarius* en CAC/GL 13-1991 (Comisión del *Codex Alimentarius*, 1991). Asimismo, ha sido evaluado favorablemente por la *Food Standards Australia New Zealand* (FSANZ, 2002) como coadyuvante tecnológico para su uso en tratamiento de las superficies de las carnes.

Conclusiones

- El sistema lactoperoxidasa es un mecanismo de defensa natural presente en el hombre y en animales como medio de lucha contra microorganismos no deseables. Los componentes del sistema (peroxidasas, peróxido de hidrógeno y tiocianato) están ampliamente distribuidos en tejidos humanos y animales.

- La actividad antimicrobiana del sistema se debe principalmente a la generación de hipotiocianito y otros intermediarios transitorios de menor actividad.
- Puede decirse que prácticamente todas las bacterias estudiadas son sensibles a la actividad del sistema lactoperoxidasa. No obstante, las bacterias Gram negativas son mucho más vulnerables que las Gram positivas.
- *Listeria monocytogenes*, por su condición de psicrotrofa y Gram positiva, es quizás la bacteria patógena de mayor interés en frutas y hortalizas de IV gama en relación con su sensibilidad frente a la acción antimicrobiana del sistema LP.
- Los datos existentes en la bibliografía no permiten concluir categóricamente si la acción del sistema sobre *Listeria monocytogenes* es bactericida o bacteriostática.
- A la vista de los datos considerados en el presente documento, se estima que el tratamiento de frutas y hortalizas frescas mediante el sistema CATALIX® presenta, frente a las bacterias patógenas estudiadas, una eficacia similar a la de la cloración.
- Las cantidades residuales de tiocianato en las hortalizas tratadas no presentan riesgo potencial para el consumidor, ya que la concentración detectada en estos productos están por debajo de los niveles endógenos descritos en la saliva humana y en las leches de vaca, oveja y cabra.

Referencias

- AESA (Agencia Española de Seguridad Alimentaria) (2005). La aplicación de altas presiones en la carne. Rev. Comité Científico de la AESA. 1, 36-71.
- AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (2003). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'autorisation d'emploi d'un système lactoperoxidase comme auxiliaire technologique pour le traitement des salades IVème gamme. Saisine n° 2003-SA-0015.
- Aune, T. M. y Thomas, E. L. (1977) Accumulation of hypotiocyanite ion during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Eur. J. Biochem.*, 80, 209 – 214.
- Bibi, W., y Bachmann, R. G. (1990) Antibacterial effect of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on the growth of *Listeria* spp. in skim milk. *Milchwissenschaft*, 45, 26 – 28.
- Björck, L. (1978). Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. *J. Dairy Res.*, 45, 109 – 118.
- Björck, L., Rosen, C. G., Marshall, V. y Reiter, B. (1975). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other Gram-negative bacteria. *Appl. Microbiol.*, 30, 199 – 204.
- Bryan, F. L. (1977). Diseases transmitted by food contaminated by waste water. *J. Food Prot.*, 40, 45 – 56.
- 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.
- Carlsson, J. Iwami, Y. y Yamada, T. (1983) Hydrogen peroxide excretion by the oral streptococci and effect of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide *Infect. Immun.*, 40, 70- 80.
- Carlsson, J., Edlund, M. B. K. y Hanstron, L. (1984) Bactericidal and cytotoxic effects of hypotiocyanite-hydrogen peroxide mixtures. *Infect. Immun.*, 44, 581 – 586.
- 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
- Cleanroom Technology (2005) Catalyst for Catalix. <http://www.cleanroom-technology.co.uk>

- Comisión del *Codex Alimentarius* (1991) Directrices para la conservación leche cruda mediante la aplicación del sistema lactoperoxidasa (CAC/GL 13-1991).
http://www.codexalimentarius.net/download/standards/29/CXG_013s.pdf
- Davidson, R.M. (2001) Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. En "Food Microbiology: fundamentals and frontiers" 2ª ed. págs. 593 – 617. Eds: Doyle, M. P., Beuchat, L. R. y Montville, T. J. *ASM Press*. Washington, D.C.
- Denis, F. y Ramet, J. P. (1989). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in tripticase soy broth, UHT milk and French soft cheese. *J. Food Prot.* 52, 706 – 711.
- Earnshaw, R. G. y Bank, J. G. (1989). A note on the inhibition of *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 in milk by an activated lactoperoxidase system. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 203 – 205.
- El-Shenawy, M. A., García, H. S. y Marth, E. H. (1990). Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by the lactoperoxidase system in raw milk, buffer or semi-synthetic medium. *Milchwissenschaft* 45, 638 – 641.
- 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. New York.
- FSANZ (Food Standards Australian and New Zealand) (2002) Final Assessment Report. Application A404. Lactoperoxidase System. 18 December. http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/A404%20FAR%20lactoperoxidase.pdf
- Gaya, P., Medina, M. y Núñez, M. (1991) Effect of lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3355 – 3360.
- Geldreich, E. E. y Bordner, R. H. (1971) Fecal contamination of fruit and vegetables. A review. *J. Milk Food Technol.*, 34, 184 – 195.
- 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.
- Gothefors, L. y Mrklund, S. (1975). Lactoperoxidase activity in human milk and saliva of newborn infants. *Infect. Immun.*, 11, 1210 – 1215.
- Härnolv, B. G. y Kandasamy, C. (1982). Increasing the keeping quality of milk by activation of its lactoperoxidase system. Results from Sri Lanka. *Milchwissenschaft* 37, 454 – 457.
- Hernández, M. C. M., van Markwijk, B. W. y Vreeman, H. J. (1990). Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk. *Neth Milk Dairy J.*, 44, 213 – 231.
- Hogg, D. M. y Jago, G. R. (1970). The antibacterial action of lactoperoxidase: the nature of the bacterial inhibitor. *Biochem. J.*, 117, 791 – 797.
- Hoogendoorn, H. (1985) Activation of the salivary peroxidase antimicrobial system: clinical studies. En "Lactoperoxidase system, Chemistry and biological significance" págs., 217 – 227. Eds: Pruit, K.M. y Tenovuo, M.A.. Marcel Dekker. New York.
- Hoogendoorn, H., Pressens, J. P., Scholtes, W. y Stoddard, L. A. (1977). Hypothiocyanite ion: the inhibitor formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Caries Res.*, 11, 77 – 84.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (1980). *Microbial Ecology of Foods*. Vol. 2: Food Commodities. Academic Press Inc. New York.
- 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.
- Kamau, D. N., Doores, S. y Pruitt, K. M. (1990). Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2711 – 2716.
- Klebanoff, S. J., Clem, W. H. y Luebke, R. G. (1966). The peroxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system antimicrobial system. *Biochim. Biophys. Acta.* 117, 63 – 72.
- Kussendrager, K.D. y Hooijdonk, A.C.M. (2000). Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and application. Br.

- J. Nutr., 84, S19-S20.
- Le Nguyen, D. D., Ducamp, M. N., Dornier, M., Montet, D., Loiseau, G. (2005) Effect of the lactoperoxidase system against three major causal agents of disease in mangoes. *J. Food Prot.* 68, 1497-1500.
- 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.
- Medina, M., Gaya, P. y Núñez, M. (1989). The lactoperoxidase system in ewes' milk: levels of lactoperoxidase and thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 147 – 149.
- Nichols, A. A., Davis, P. A., King, K. P., Winter, E. J. y Blackwall, F. L. C. (1971) Contamination of lettuce irrigated with sewage effluent. *J. Hortc. Sci.*, 46, 425 – 433.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P. y Chackraborty, T. (1998). Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 61, 244 – 248.
- Paul, K. G. y Ohlsson, P. I. (1985). The chemical structure of lactoperoxidase. En "Lactoperoxidase system, Chemistry and biological significance" págs., 15 – 29. Eds: Pruit, K. M. y Tenovuo, M. A. Marcel Dekker. New York.
- Purdy, M. A., Tenovuo, J., Pruit, K. M. y White, W. W. (1983) Effect of growth phase and cell envelope structure on susceptibility of *Salmonella typhimurium* to the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system. *Infect. Immun.*, 39, 1187 - 1195
- Reiter, B. y Härnulf, G. (1984) Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Prot.*, 47, 724 – 732.
- Reiter, B. y Perraudin, J. P. (1991). Lactoperoxidase biological functions. En "Peroxidases in Chemistry and Biology" págs. 143 – 180. CRC Press. Boca Raton.
- Reiter, B., Marshall, V. M. E., Björck, L. y Rosen, C. G. (1976). Nonspecific bacterial activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system of milk against *Escherichia coli* and some Gram-negative pathogens. *Infect. Immun.*, 13, 800 – 807.
- SCVPH (Scientific committee of the European Union on veterinary measures relating to public health) (1999). Opinion on *Listeria monocytogenes*. Adopted on 23 September 1999. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out25_en.pdf
- Siragusa, G. R. y Johnson, M. G. (1989) Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxidase-thiocyanate-H₂O₂ antimicrobial system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2802 – 2805.
- Thanabal, V. y La Mar, G. N. (1989). A nuclear Overhauser effect investigation of the molecular and electronic structure of the heme crevice in lactoperoxidase. *Biochemistry*, 28, 7038 – 7044.
- Thomas, E. L. (1985). Products of lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate and halides. En "Lactoperoxidase system, Chemistry and biological significance" págs. 31 – 53. Eds: Pruit, K. M. y Tenovuo, M. A. Marcel Dekker. New York.
- Wilkins, K. M. y Board, R. G. (1989). Natural antimicrobial systems. En "Mechanisms of action of food preservation procedures" págs. 285 – 362. Ed: Gould, G.W. Elsevier Applied Science. London.
- Witt, J. N. y van Hooydonk, A. C. M. (1996). Structure, function and application of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Neth. Milk Dairy J.*, 50, 227 – 244.
- Wolfson, L. M. y Sumner, S. S. (1993) Antimicrobial activity of the lactoperoxidase system. A review. *J. Mol. Biol.*, 226, 185 – 207.
- Zapico, P., Gaya, P., De Paz, M., Núñez, M. y Medina, M. (1991). Influence of breed, animal and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk. *J. Dairy Sci.*, 74, 783 – 787.
- Zapico, P., Gaya, P., Núñez, M. y Medina, M. (1995). Activity of goats' milk lactoperoxidase system on *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* at refrigeration temperatures. *J. Food Prot.* 58, 1136-1138.
- Zapico, P., Gaya, P., Núñez, M. y Medina, M. (1995). Goats' milk lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 56, 988- 990.