



Departamento de
Producción Animal
y Ciencia de los Alimentos
Universidad Zaragoza



***Listeria monocytogenes* en productos cárnicos**

LPC. Resistencia a los antibióticos

Trabajo Fin de Máster

**Máster en Iniciación a la Investigación en Ciencia y Tecnología de los
Alimentos**

Curso 2011-2012

Noelia Marco Ruesca

Tutor: Javier Yangüela Martínez

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación está financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (España) mediante el Proyecto Consolider-Ingenio 2010; Carnisenusa (CSD 2007-00016). También, nuestro agradecimiento a la Diputación General de Aragón por el proyecto: Grupo Consolidado de Investigación (ref.: A01/2011) “Análisis y evaluación de la seguridad alimentaria” y Fondo Social Europeo 2007-210.

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. <i>Listeria</i> y listeriosis	2
1.1.1. Taxonomía.....	2
1.1.2. Características generales	2
1.1.3. Ecología microbiana	3
1.1.3.1. Temperatura	3
1.1.3.2. Activad de agua.....	4
1.1.3.3. Efecto del pH.....	4
1.1.3.4. Efecto de tratamientos	4
1.1.4. Listeriosis.....	4
1.1.4.1. Origen y transmisión de la listeriosis	5
1.1.4.2. Principales alimentos implicados.....	5
1.1.4.2.1. Categoría 1	6
1.1.4.2.2. Categoría 2	7
1.1.4.2.3. Categoría 3:	7
1.1.4.3. Patogenia	7
1.1.4.4. Población susceptible	8
1.1.4.5. Sintomatología y tratamiento.....	8
1.1.4.6. Epidemiología	9
1.1.4.7. Control de la listeriosis.....	11
1.1.5. Procedimientos de recuento e investigación de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos.....	12
1.1.6. Legislación de <i>Listeria monocytogenes</i> relacionada con los alimentos.....	12
1.1.7. Antibiorresistencias	13
1.1.7.1. Historia.....	13
1.1.7.2. Clasificación de los antibióticos	13
1.1.7.3. Sensibilidad y resistencia de <i>Listeria spp</i> a los antibióticos.....	14
1.1.7.4. Problemática de la resistencia antibiótica de <i>Listeria spp</i>	14
1.1.7.5. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antibióticos ..	15
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Materiales	17

3.1.1. Medios de cultivo y suplementos	17
3.1.2. Material desechable	18
3.1.3. Material de metal y de vidrio.....	18
3.1.4. Mantenimiento de cepas	18
3.1.5. Equipos:.....	18
3.2 Métodos	19
3.2.1 Muestras analizadas.....	19
3.2.2. Toma de muestras	20
3.2.3. Recuento e investigación de <i>L. monocytogenes</i>	20
3.2.3.1. Medios de enriquecimiento.....	20
3.2.3.2. Enriquecimiento en caldo Fraser	20
3.2.3.2.1. Recuentos bajos de <i>L. monocytogenes</i>	20
3.2.3.2.2. Investigación de <i>L. monocytogenes</i>	20
3.2.3.3 Enriquecimiento en caldo ONE- <i>Listeria</i>	21
3.2.3.3.1. Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	21
3.2.3.3.2. Investigación <i>L. monocytogenes</i>	21
3.2.3.3 Enriquecimiento en caldo EB	22
3.2.4. Recuento de placas de agar ALOA	22
3.2.5. Identificación bioquímica.....	22
3.2.6. Medida del pH:.....	23
3.2.7. Medida de la a_w	23
3.2.7.1. Calibración Decagon CX-1: medida a_w	23
3.2.8. Antibiograma o test de sensibilidad a los antimicrobianos	24
3.2.8.1. Calibración del espectrofotómetro.....	24
3.2.8.2. Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	25
3.2.8.3. Método de difusión en disco	26
3.2.8.3.1. Cepas de los microorganismos control estudiadas	26
3.2.8.3.2. Cepas <i>Listeria</i> spp. estudiadas.....	26
3.2.8.3.3. Preparación del inóculo.....	27
3.2.8.3.4. Estandarización del inóculo.....	27
3.2.8.3.5. Siembra de las placas de agar Mueller-Hinton.....	27
3.2.8.3.6. Colocación los discos de antibióticos.	27
3.2.8.3.7. Lectura de resultados.	28

3.2.8.3.7. Método Epsilon test (E-test).....	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Recuento y detección de <i>Listeria</i> spp. en productos cárnicos cocidos LPC.....	30
4.1.1 Recuentos bajos de <i>L. monocytogenes</i>	30
4.1.2 Detección de <i>Listeria</i> spp.....	30
4.1.3 Evolución de la presencia de <i>Listeria</i> spp. a lo largo del periodo de duración mínima.	31
4.2. Preconfirmación y confirmación bioquímica de <i>Listeria</i> spp.....	33
4.3. Medida del pH y de la actividad de agua	34
4.3.1. Actividad de agua.....	34
4.3.2. Medida del pH del enriquecimiento en el medio EB.	36
4.4. Análisis estadístico de los resultados.....	37
4.4.1. Relación de los tres procedimientos de enriquecimiento en la detección de <i>Listeria</i> spp.	37
4.4.2 Influencia del tiempo de almacenamiento del producto	39
4.4.3 Influencia de la temperatura de almacenamiento del producto.....	40
4.4.4. Influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento	41
4.4.5 Relación del ennegrecimiento del medio de enriquecimiento con la presencia de <i>Listeria</i> spp.....	41
4.5 Resultado del estudio de antibiorresistencia a las cepas de <i>Listeria</i> spp.	43
4.5.1. Determinación del inóculo de siembra para la realización del antibiograma .	43
4.5.2. Control de calidad de las cepas de referencia	44
4.5.3. Resultados de los antibiogramas de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. innocua</i>	45
4.5.3.1. Método de difusión en disco	45
4.5.3.2. Método de Epsilon-test (E-test).....	46
4.5.3.3. Sensibilidad o resistencia de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. innocua</i>	48
5. CONCLUSIONES	50
6. REFERENCIAS.....	52

RESUMEN

Se ha realizado el recuento y la detección de *Listeria monocytogenes* en 51 productos cárnicos cocido LPC, comprados en establecimiento de venta al por menor. Fueron analizados, siguiendo la normativa UNE-EN-ISO 11290-1, UNE-EN-ISO 11290-2, y el método de cultivo rápido Listeria Precis™ validado por la AFNOR (Oxoid, 2010) para recuento y detección de *L. monocytogenes*, y la Norma Mexicana NOM-143-SSA1-1995 únicamente para la detección, siguiendo el criterio de presencia o ausencia en 25 gramos. Los análisis microbiológicos se realizaron el mismo día de la compra, a mitad del periodo de duración mínima almacenados a 4°C y 10°C y final de este periodo, almacenadas a las mismas temperaturas.

De las cepas de 26 cepas *L. monocytogenes* y 15 de *L. innocua* aisladas de los 51 productos muestreados, se estudio la sensibilidad a 20 antibióticos para la especie patógeno y de 25 antibióticos para la no patógena, dada la problemática de antibiorresistencias transmitidas por alimentos. Se realizo mediante el método de difusión en placa verificando resultados con el método Epsilon test, ambos recomendados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio Clínico (CLSI), así como por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST).

Tras el análisis por los tres métodos utilizados en 3 (5,9 %) de las 51 muestras obtuvieron recuentos de *L. monocytogenes*. Ninguna de las 3 muestras presentó recuentos el día de la compra, una muestra presentó recuentos a lo largo de su periodo de duración mínima almacenadas a 4°C y 10°C, siendo mayor el número de ufc/g a 10°C, oscilando los recuentos entre 1×10 a $5,9 \times 10^2$ ufc/g. En un 19,6 % de las muestras se detectó *L. monocytogenes*, existiendo en el almacenamiento de los productos a 10°C, un incremento de ambas especies hasta mitad del periodo de duración mínima, aumentando la presencia de *L. monocytogenes* hasta el final, mientras que *L. innocua* permanece constante. Respecto a los métodos utilizado, se observo una mayor detección de *L. monocytogenes* mediante la normativa UNE-EN-ISO 11290-1, que mediante los otros procedimientos utilizados, siendo el método indicado por la Norma Mexicana NOM-143-SSA1-1995, el que menor detección presento.

De los 20 antibióticos estudiados para ambas especies y los 5 supernumerarios estudiados únicamente para *L. innocua*, se observa una alta sensibilidad al 90% de los antibióticos para las cepas *L. monocytogenes*; mientras que en el caso de las cepas de *L. innocua* se comprueba una sensibilidad frente del 84% de los 25. Coincidiendo los antibióticos a los que fue muy sensible la especie patógena, con excepción de la penicilina G y la tetraciclina, frente a los cuales *L. innocua* se muestra intermedia o resistente. De forma que, *L. monocytogenes* mostró un 19,2 % de resistencia frente a clindamicina mientras que *L. innocua* lo fue frente a clindamicina con un 80%, tetraciclina con un 52%. Ambas especies de *Listeria* mostraron resistencia total a la oxacilina.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Listeria* y listeriosis

1.1.1. Taxonomía

Listeria monocytogenes se describió por primera vez hace más de 60 años, cuando Murray y col. en 1926 aislaron una bacteria corta, Gram positiva, de forma bacilar y que producía patologías en conejos y cobayas. La denominaron *Bacterium monocytogenes* porque infectaba a los leucocitos sanguíneos. A finales del siglo XIX ya se describían microorganismos similares a *Listeria monocytogenes* que causaban infección tanto en animales como en personas. Pirie en 1930 aisló en hígado de gerbos una bacteria similar a la que denominó *Listerella hepatolytica* en nombre del famoso cirujano Joseph Lister (1827-1912), el cual fue uno de los primeros científicos que relacionaron la asepsia con un menor número de casos de infecciones. Es importante citar que anteriormente el nombre de "*Listerella*" fue adoptado por un grupo de mohos productores de mucílago. Fue en 1940, finalmente, cuando se acordó el nombre actual de *L. monocytogenes*.

La clasificación taxonómica de *Listeria monocytogenes* es: Dominio: *Bacteria*, Filo: *Firmicutes*, Clase: *Bacilli*, Orden: *Bacillales*, Familia: *Listeriaceae*, Genero: *Listeria*. Hasta el año 2007, 6 especies de *Listeria* habían sido publicadas en la lista de validación del IJSEM ("International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology"): *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* (subsp. *ivanovii* y *londoniensis*), *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi* y *Listeria welshimeri*, en 2010 *Listeria marthii* es validada como especie (Graves y col., 2010) y recientemente se ha validado *Listeria rocourtiae* (Leclercq y col., 2010).

Las especies patógenas para el ser humano son *Listeria ivanovii* y *Listeria monocytogenes*, siendo esta última la que se aísla mayoritariamente en casos humanos y la responsable de la mayor parte de las infecciones que afectan al hombre; aunque se han registrado algunos casos de infecciones producidas por *L. ivanovii* (Guillet y col., 2010). En cuanto a *Listeria monocytogenes* puede presentar 14 serotipos como se muestra en la base de datos del National Centre for Biotechnology information (BLAST) pero los más patógenos y que se suelen aislar en los casos de listeriosis son los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b, produciendo el 95% de los casos de infección (Liu, 2006).

1.1.2. Características generales

Según la Sociedad Española de Microbiología Clínica (SEIMC) podemos definir a *L. monocytogenes* como un bacilo corto, Gram-positivo, no esporógeno, que se encuentran en pares o como células aisladas de 10 µm de longitud. Algunas veces se observan en cadenas cortas en forma de V o Y o formando empalizadas. Las colonias son pequeñas (1-2 mm tras 1 o 2 días de incubación) y lisas.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37 °C, pero puede crecer a 4°C, ya que es una bacteria psicrotrófica. Crece en aerobiosis y en anaerobiosis, por lo que se considera un microorganismo anaerobio facultativo. Es una bacteria móvil a 25°C con una modalidad de

“volteo” o “barrilete” mediante flagelos peritricos e inmóviles a 35°C (Junttila y col., 1988; Miller, 1992; Larson y col., 1999).

En cuanto a sus características bioquímicas (Tabla 1), es un microorganismo con reacción positiva a la prueba de la catalasa y oxidasa negativo; las reacciones de Vogues-Proskauer y rojo metilo son positivas, no producen indol ni H₂S. Además produce ácido por la fermentación de varios azúcares: D-glucosa, D-arabitol, ramnosa y es β-hemolítica.

Tabla 1.- Propiedades bioquímicas de *Listeria* spp. (Seeliger y Jones, 1986; Graves y col., 2010; Leclercq y col., 2010). Especies: 1, *L. monocytogenes*; 2, *L. innocua*; 3, *L. seeligeri*; 4, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*; 5, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*; 6, *L. welshimeri*; 7, *L. grayi*; 8, *L. rocourtiae* sp. nov.; 9, *L. marthii* sp. nov. Todas las especies hidrolizan la esculina.

Característica	1	2	3	4	5	6	7	8	9
β-Hemólisis	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<u>Reacción CAMP</u>									
<i>S. aureus</i>	+	-	(+)	-	-	-	-	-	ND
<i>R. equi</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	ND
Arylamidasa	-	+	+	v	v	v	+	-	ND
PIPLC	+	-	-	+	+	-	-	-	ND
α-Manosidas	+	+	-	-	-	+	v	+	ND
<u>Fermentación de:</u>									ND
Manitol	-	-	-	-	-	-	+	+	-
D-Arabitól	+	+	+	+	+	+	+	-	ND
D-Xilosa	-	-	+	+	+	+	-	+	-
Ramnosa	+	v	-	-	-	v	-	+	-
Metil α-D-glucosido	+	+	+	+	+	+	v	+	ND
Ribosa	-	-	-	-	+	-	+	+	ND
Glucosa-1-fosfato	-	-	-	v	v	-	-	-	ND
D-Tagatosa	-	-	-	-	-	+	-	-	ND

1.1.3. Ecología microbiana

En cuanto a la ecología microbiana de la *L. monocytogenes*, podemos destacar las siguientes características:

1.1.3.1. Temperatura

Puede sobrevivir en condiciones de congelación, resistiendo varias semanas a -18°C en varios sustratos alimenticios, aunque en condiciones ácidas o de laboratorio su supervivencia se acorta.

El rango de temperatura de crecimiento de esta bacteria oscila desde 0 a 50°C, a estas temperaturas con un pH neutro y con elevadas concentraciones de nutrientes en el ambiente, *L. monocytogenes* presenta un crecimiento lento con tiempos de generación de 3 a 6 días. En presencia de microorganismos competitivos y a niveles de pH más bajos (carne picada,

hígado...) a veces sobrevive sin multiplicarse a temperaturas de 4°C. Su crecimiento mejora conforme aumenta la temperatura.

La temperatura mínima media de crecimiento en agar tripticasa de soja de 78 cepas de *L. monocytogenes* fue de 1,1 °C a 0,3 °C, con una variación de 0,5 a 3 °C; el hecho de que estas cepas tuviesen esta temperatura mínima de crecimiento sugirió la posibilidad de que la hemolisina incrementase el crecimiento y la supervivencia en los medios fríos (Jay, 1992).

1.1.3.2. Actividad de agua

Su a_w tiene como límite inferior aproximadamente 0.90 a 30 °C en presencia de glicerol para controlar su actividad, mientras que a 4°C y 10°C es de 0.92 y 0.93, utilizando NaCl y sacarosa respectivamente como sustrato. El crecimiento de *L. monocytogenes* con actividad de agua entre 0,924 y 0,921 es muy reducido (Trepatt, 2002).

1.1.3.3. Efecto del pH

El pH mínimo de crecimiento depende de diferentes factores como la temperatura de incubación, la composición general de nutrientes del sustrato de crecimiento y la presencia o cantidad de NaCl y otras sales e inhibidores. *L. monocytogenes* es capaz de resistir un amplio margen de pH, siendo el límite superior de 9.6 y el inferior de 4.6-5.0, con un rango óptimo de pH 6-8.

La interacción de pH, temperatura y NaCl están correlacionados, de forma que a pH 4,66 y una temperatura de 30 °C se aprecia crecimiento a los 5 días sin adición de NaCl, a los 8 días con un 4 % de sal y a los 13 días con un 6 % de sal. Mientras que a 5 °C solo hubo crecimiento a pH 7 en 9 días sin sal, y 15 días con 4% de sal (Jay y col., 2005)

1.1.3.4. Efecto de tratamientos

La irradiación gamma afecta a *L. monocytogenes* en el mismo orden que lo hace al resto de las bacterias Gram +, variando valores desde 0.34kGy hasta 2kGy en helado a -78°C.

En ausencia de materia orgánica e *in vitro*, al igual que en superficies húmedas muchos desinfectantes son eficaces contra *L. monocytogenes*, mientras que en superficies secas es mucho más resistente.

El cambio en los componentes de la atmósfera resulta poco eficaz contra *L. monocytogenes*. En condiciones aeróbicas, microaerófilas y anaeróbicas se han observado tiempos de generación parecidos, sin que existan indicios de que elevadas concentraciones de CO₂ ejerza un efecto inhibitorio.

En lo que respecta a tratamientos por calor, la pasteurización comercial de 71°C durante 15 min inactiva la bacteria.

1.1.4. Listeriosis

L. monocytogenes, es un patógeno oportunista ya que puede sobrevivir y multiplicarse fuera de los hospedadores animales. Debido a esta característica junto con su carácter ubicuitario, puede colonizar empresas de elaboración de alimentos. Se considera una bacteria patógena emergente, ya que es a partir de 1980 cuando se empieza a aislar de alimentos como

consecuencia de cambios en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos. Además, hay que añadir los cambios de hábitos con la alimentación de la población, ya que se comprueba un incremento en el consumo de alimentos listos para el consumo (LPC). El riesgo de que se presente una listeriosis se incrementa cuando estos alimentos son consumidos por personas encuadradas en el grupo de “alto riesgo”, entre las que se encuentran mujeres embarazadas, neonatos, personas inmunodeprimidas y personas mayores (>65 años).

La Listeriosis, se trata de una enfermedad poco común pero grave, de origen alimentario y que es causada por el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. El informe sobre prevalencia y fuentes de zoonosis en España del año 2006 (Report on trends and sources of zoonoses, Spain 2006), señala que la importancia de la listeriosis en salud pública no siempre es reconocida, dado que es rara en comparación con otras enfermedades de transmisión alimentaria como la Salmonelosis y que su periodo de incubación tan largo (hasta 70 días) puede dificultar la realización de encuestas epidemiológicas (ICMSF, 2002).

L. monocytogenes es una bacteria que causa zoonosis, ya que infecta a gran variedad de animales como al vacuno, ovino, aves, roedores, peces y crustáceos. El pienso que consumen los animales, en especial al ensilado mal conservado, es una entrada de la bacteria en los animales, aunque al ser una bacteria ubicuitaria, cualquier alimento es susceptible a su presencia.

A pesar de su potencial zoonótico, también es un importante contaminante medioambiental, de relevancia a nivel de salud pública.

1.1.4.1. Origen y transmisión de la listeriosis

L. monocytogenes, al tratarse de una bacteria ubicuitaria se puede encontrar en una amplia variedad de lugares. En el medio ambiente se puede hallar en suelos, vegetales, pastos, aguas dulces y marinas, lodos, en explotaciones ganaderas, e incluso en hogares, puede llegar a sobrevivir de 1-2 años en suelo. También se puede encontrar en animales y en el hombre, encontrándose en un 10-30% y de un 3-11 %, respectivamente, como portadores intestinales. Este porcentaje aumenta entre personal de laboratorio, trabajadores de mataderos y veterinarios clínicos. La tasa de estos “portadores sanos” contrasta con la baja frecuencia con que se detecta la enfermedad: 1 a 3 casos anuales por millón de habitantes (Gómez, 1993).

La principal vía de transmisión de *L. monocytogenes* es la contaminación cruzada a partir de superficies, instalaciones, equipos de corte, utensilios y manipuladores; a lo cual hay que sumar la dificultad de eliminar los biofilms y el cruce entre productos frescos y terminados. Otras vías de relevancia son la contaminación en el origen del alimento, mediante la ingestión de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* o bien mediante contacto directo nosocomial (poco frecuente) o con animales. Por último, otra de las vías de transmisión es la materno-fetal, ya que se ha comprobado que puede transmitirse a través de la placenta.

1.1.4.2. Principales alimentos implicados

Entre los alimentos más frecuentemente contaminados podemos encontrar el queso, la leche cruda y pasteurizada (David y col., 1985), carnes frescas de mamíferos, aves y productos cárnicos fermentados y pasteurizados, pescados y mariscos tanto frescos como

ahumados, frutas, hortalizas y verduras. Pero a pesar de que son muchos los alimentos que pueden contaminarse con *L. monocytogenes*, los casos están principalmente relacionados con alimentos LPC. Varios brotes han sido asociados con el consumo de estos tipos de alimentos, tales como leche cruda, quesos blandos, pescado ahumado y productos cárnicos y embutidos fileteados (EFSA, 2007). Se trata de una categoría de alimentos grandes y heterogéneos entre los que se encuentran alimentos con características físico-químicas favorables (Tabla 2), para la multiplicación de la bacteria:

Tabla 2: Características físico-químicas de diferentes grupos alimentarios

	PH	a _w
Lácteos	6.6	> 0.98
Cárnicos	7-5.5	0.99
Pescados	4.8-7.3	0,95-0.99
Frutas-vegetales	4.0-7.0	>0.95

Es importante destacar la presencia de *Listeria spp.* en superficies alimentarias como máquinas fileteadoras, tablas de corte y utensilios, así como la posterior contaminación del alimento durante el procesado. Ya que la presencia de *L. monocytogenes* en los productos LPC radica en la recontaminación que se produce tras el tratamiento térmico, en la manipulación y durante su procesado, así como durante la posterior conservación en refrigeración, ya que debido a que se trata de un bacteria psicrotrofa, y la refrigeración va a reducir la microbiota competitiva, se crea un ambiente idóneo para la multiplicación de *L. monocytogenes*. Observándose unas tasas de prevalencia de *L. monocytogenes* de un 3% en canales de cerdo, 12,5 % en jamones crudos y un 2% en jamón curado (Annunziata y col., 2011).

El cambio en los hábitos alimentarios debido a un cambio en la forma de vida, ha conducido a un consumo cada vez mayor de alimentos fuera del hogar, lo que ha hecho que cada vez sea mayor la producción de alimentos LPC.

Según la FAO/OMS (2004) dentro de alimentos LPC se incluye cualquier alimento (incluidas bebidas) que se consume normalmente en crudo o cualquier alimento manipulado, elaborado, mezclado, cocinado o transformado de otro modo en un tipo de alimento que se consume normalmente sin elaboración adicional. Una definición más concisa es la recogida en el Reglamento (CE) 2073/2005 (Anónimo, 2005) (que los define como alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumidor humano, sin la necesidad de cocinado y otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a nivel aceptable los microorganismos peligrosos.

La AFSSA clasifica este tipo de alimentos según el riesgo debido a la presencia de *L. monocytogenes* (AFSSA, 2005) en tres grupos, exceptuando de esta clasificación los alimentos que sufren un tratamiento térmico o cualquier otro tratamiento tecnológico que asegure la destrucción de *L. monocytogenes*, y así lo reconozca la autoridad competente. De manera que este alimento llegue al consumidor exento de *L. monocytogenes*.

1.1.4.2.1. Categoría 1

Esta categoría incluye los alimentos que precisan una cocción o cualquier otra transformación antes de ser consumidos, que asegure la eliminación o reducción del microorganismo a un nivel aceptable. Los consumidores deberán conocer perfectamente las

condiciones de conservación y preparación de estos alimentos, y toda la información deberá figurar en la etiqueta.

Un ejemplo de este tipo de alimentos LPC son los preparados cárnicos a base de carne picada, que se someten a un tratamiento de plancha o fritura suficiente para reducir en su interior la carga microbiana.

En aquellos casos en que los productos a base de carne picada se vayan a consumir parcial o totalmente crudos, no habrá que considerarlos en esta categoría.

1.1.4.2.2. Categoría 2

Se encuadran en esta categoría los alimentos LPC que en el momento de la puesta a la venta no contienen *L. monocytogenes* o sus niveles son inferiores al criterio microbiológico reglamentado y además no permiten la multiplicación de la bacteria. También se incluyen los alimentos en los que se puede documentar experimentalmente que *L. monocytogenes* no crece en el producto o se dispone de bibliografía científica que ratifica la imposibilidad de crecimiento de *L. monocytogenes* en el producto.

Algunos ejemplos que podemos citar en este grupo son alimentos con $\text{pH} < 4.2$, o < 4.5 si la acidificación se obtiene con ácido láctico o ácido acético; alimentos con una actividad de agua inferior a 0.90 y productos congelados o ultracongelados.

1.1.4.2.3. Categoría 3:

Dentro de esta última categoría se incluyen los alimentos LPC en los que puede multiplicarse *L. monocytogenes* y donde la seguridad sanitaria y la conformidad a los criterios microbiológicos depende de a su vez de la aplicación de buenas prácticas higiénicas (BPH) y un sistema de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC) a lo largo de la cadena alimentaria, la fijación correcta del periodo de duración mínima del alimento en función de criterios microbiológicos y de una buena información destinada al consumidor sobre la temperatura de conservación, el periodo de duración mínima y el uso previsto.

Como ya se ha comentado cualquiera de las operaciones de loncheado, troceado y envasado van a incrementar el riesgo por contaminación cruzada. Esto, unido a la conocida prevalencia de *L. monocytogenes* en productos cárnicos, mayor en los cocidos, debido a sus características de pH neutro, bajos niveles de sal y su periodo de duración mínimo, hace que los consideremos uno de los grupos de mayor riesgo por *L. monocytogenes*. Por lo tanto, este será el grupo de alimentos objeto de nuestro estudio.

1.1.4.3. Patogenia

Hoy en día se han identificado diversos determinantes moleculares de virulencia que juegan un papel muy importante en la infección celular por *L. monocytogenes*. El hecho de que todavía no sea conocido su mecanismo de acción, hace de esta bacteria patógena uno de los modelos más interesantes de interacción patógeno-hospedador, tanto a nivel celular como molecular.

Estos determinantes de virulencia comprenden, entre otros, las internalinas, la listeriolisina O (LLO), la proteína Act A, dos fosfolipasas, una metaloproteasa y una hidrolasa de sales biliares. A pesar de que existe polimorfismo entre diferentes cepas de *L. monocytogenes*

respecto a algunos de estos determinantes de virulencia, este hecho no puede correlacionarse con la capacidad o la incapacidad del organismo para producir enfermedad.

L. monocytogenes es una bacteria intracelular facultativa, ya que puede sobrevivir en macrófagos e invadir células no fagocíticas como las células epiteliales, hepatocitos y células endoteliales. La capacidad del microorganismo para penetrar en el citoplasma de la célula, proliferar y diseminarse a las células adyacentes es esencial para la expresión plena de su potencial patógeno.

Su unión a la célula huésped se produce debido a la proteína integrina. Una vez en el interior, es fagocitada por la célula huésped y en el fagolisosoma es sometida a un ambiente hostil con pH y ferritina bajo, activando una exotoxina (listeriolisina O) que es capaz de lisar la membrana del fagolisosoma en 30 minutos y escapar al citoplasma. La listeriolisina O es una exotoxina hemolítica y citolítica que actúa como un factor crítico de virulencia de *L. monocytogenes*. *Listeria* se disemina célula a célula sin ponerse en contacto con el medio extracelular, lo que explica la necesidad de una inmunidad mediada por células (Torres y col., 2005).

1.1.4.4. Población susceptible

L. monocytogenes es un microorganismo que provoca daños severos con tasas bajas de morbilidad pero tasas altas de mortalidad en grupos vulnerables (30%), como personas con el sistema inmune deprimido, entre las que se incluyen ancianos, mujeres embarazadas y recién nacidos. El sistema inmune de estos colectivos está a menudo deprimido y el microorganismo patógeno es capaz, una vez ingerido, de causar infecciones en diversas partes del cuerpo y de causar meningitis, encefalitis, septicemias y abscesos hepáticos.

La dosis infectiva es de $10^3 - 10^7$ ufc/ g. La dosis infectiva variará en función de tres factores: i) estado inmunitario del individuo, ii) la virulencia de la cepa, iii) cantidad de *L. monocytogenes* en el alimento.

El periodo de incubación de la enfermedad puede ir desde una hora hasta 11-70 días (ICMSF, 2002).

1.1.4.5. Sintomatología y tratamiento

Los síntomas de esta enfermedad de transmisión alimentaria son variables, desde un cuadro leve, que simula una gripe con fiebre, dolores musculares y sintomatología gastrointestinal, hasta una sepsis grave, sobre todo en edades extremas de la vida (recién nacidos y ancianos) y pacientes inmunodeprimidos, que causa aborto en embarazos, neumonía y granulomas diseminados en recién nacidos, meningitis y meningoencefalitis, e incluso septicemia causando la muerte del individuo. Estos son los principales síntomas, aunque se han descrito otros como: sepsis o bacteriemia aislada en adultos (incluyendo gestantes), endocarditis sobre válvula nativa o protésica, infecciones de prótesis arteriales, hepatitis, absceso hepático, Peritonitis bacteriana espontánea, peritonitis en pacientes con diálisis peritoneal ambulatoria continua, osteomielitis, artritis, empiema (Ooi y col., 2005). Las formas clínicas derivadas de la infección por *Listeria* comprenden la colonización intestinal asintomática, la GEA autolimitada (no invasiva) y la enfermedad invasora (bacteriemia primaria,

meningitis, romboencefalitis y absceso cerebral, endocarditis y otras formas focales) (Drevets y Bronze, 2008).

Es importante que el tratamiento sea lo más precoz posible, administrando una serie de antibióticos. Debido a que se trata de una enfermedad relativamente rara en humanos, no hay estudios prospectivos y controlados que establezcan el mejor tratamiento antibiótico. Actualmente se considera que las mejores opciones son la penicilina o la ampicilina, solas o asociadas a gentamicina. El más utilizado es la asociación de ampicilina y gentamicina. La combinación de trimetoprim y sulfametoxazol se ha utilizado con éxito en pacientes alérgicos a penicilinas, considerándose en la actualidad la terapia alternativa en esta circunstancia. La duración apropiada del tratamiento no está muy clara. En general dos semanas parecen ser suficientes en bacteriemias mientras que en meningitis se deberían utilizar ciclos más largos.

Un estudio retrospectivo efectuado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza realizado entre enero de 1997 y octubre de 2010 para el tratamiento de *L. monocytogenes*, muestra que de 28 casos (21 adultos y 7 neonatos), en los cuales se utilizó como tratamiento de elección ampicilina, asociado generalmente a aminoglucósidos (gentamicina), en dosis altas fue muy efectivo, probando que la asociación de ambos antibióticos ejerce un efecto sinérgico (Palacián y col., 2011).

1.1.4.6. Epidemiología

La incidencia anual de la listeriosis humana fluctúa de 0,1 a 11 casos por 1.000.000 de habitantes (Notermans et al., 1998), con unos 0,3-7,5 casos por millón de personas en Europa y de 3 casos por millón de personas en Australia. En EE.UU., los datos de CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades) generados a través de FoodNet (Red de Control de Enfermedades Alimentarias) también reflejaron una incidencia de 5 casos por millón de personas en 1998. Sin embargo, datos más recientes de FoodNet del año 2003 con relación a la incidencia de enfermedades y mortalidad por microorganismos de origen alimentario indican una reducción del número de casos de listeriosis a 3,3 casos por millón de habitantes. Actualmente 1,12 casos por cada 100.000 habitantes en España, según el último informe (EFSA, 2012).

A lo largo de los años se han descrito diferentes casos de listeriosis en todo el mundo, Se considera una enfermedad emergente, siendo el panel sobre peligros biológicos BIOHAZ en 2007 (EFSA, 2007), quien concluyo que después del descenso generalizado que se dio en la década de 1990, desde el año 2000 los casos de listeriosis han aumentado en Europa.

Marcos (2007) cita que en España en 2005, el número de casos debidos a *L. monocytogenes* fue de 69 según recoge el Sistema de Información Microbiológica Español (CNE 2005) y que la carne fue el alimento principalmente implicado.

En el último informe de la EFSA (2012), se muestra los casos de listeriosis confirmados entre 2005 y 2010 (Tabla 3).

Tabla 3: Casos de listeriosis confirmados en España y en la Unión Europea (UE) en los últimos años

Año	Casos España	Casos UE
2005	68	1591
2006	78	1581
2007	81	1425
2008	88	1654
2009	121	1601
2010	129	1614

Como se puede observar se está produciendo un aumento ligero y progresivo de los casos de listeriosis tanto en España como en la suma de todos los países de la EU.

Analizando otros datos publicados por la (EFSA,2012) se puede ver que los productos cárnicos fueron los que más casos positivos de *L. monocytogenes* obtuvieron, en mayor medida los elaborados con carne de cerdo y bovino (32%), seguido de pescado y productos del mar (29%), alimentos LPC(19%) , carne de ave (13%) y otros), productos lácteos (12%), vegetales (10%), tenido porcentajes muchos menores los quesos (1%).

Dada la gran diversidad de alimentos implicados, y el carácter de *L. monocytogenes* de colonizar cualquier lugar, en las últimas décadas se han ido produciendo diferentes brotes, repartidos por todo el mundo, como se muestra en la Tabla 4.

Entre los últimos brotes de listeriosis ocurridos destacan por su importancia el que tuvo lugar en Canadá en 2008. El brote se originó en las líneas 8 y 9 de producción de deli-meats de la fábrica de Maple Leaf Foods. Se cree que alrededor de 220 productos presentaron contaminación de *L. monocytogenes* dando lugar a 57 casos de listeriosis y 23 decesos.

Más reciente que el anterior brote ha sido el que tuvo lugar en EE.UU. en julio de 2011. El brote se originó por el consumo de melones cantaloupe contaminados procedentes de la compañía Jensen Farms de Colorado. Se cree que fue producido por malas condiciones en el envasado. Se produjeron 123 casos repartidos en 26 estados de EE.UU., de los cuales 25 fallecieron.

Tabla 4: Brotes *L. monocytogenes* y alimentos implicados

Año	Lugar	Nº casos	Muertes	Alimento
1979	Boston	20	5	Ensaladas y/o leche pasteurizada
1980	Nueva Zelanda	29	9	Frutos del Mar
1981	Canadá	41	7	Ensalada de col
1983	Massachusetts	49	14	Leche pasteurizada
1985	California	142	48	Queso tipo mexicano
1983/87	Suiza	122	31	Queso Vacherin (Mont d'Or)
1986/87	Philadelphia	36	16	Helado / Salami
1987/89	Reino Unido	>300	>90	Pates
1992	Francia	279	85	Lengua de cerdo con gelatina
1994	USA	45	0	Batido de Chocolate
1995	Francia	33	4	Queso Brie
1997	Italia	1594	0	Harina de maíz
1998	USA	100	20	Salchicha alemana
1999	Finlandia	25	6	Mantequilla pasteurizada
2000	Francia	>33	>10	?
2002	USA	46	7	Comida turca preparada
2007	Noruega	21	5	Queso fresco
2008	Canadá	57	23	Productos cárnicos
2009	Austria/Alemania	>14	6	Queso fresco
2011	EE.UU	123	25	Melones

1.1.4.7. Control de la listeriosis

La prevención de la listeriosis humana comienza en la granja y continúa durante todo el proceso de elaboración del producto hasta que es ingerido por el consumidor. La aplicación de medidas de control puede reducir el riesgo de la listeriosis transmitida por los alimentos. Podemos actuar en diferentes puntos de la cadena alimentaria para lograr su control.

En las granjas tenemos que evitar las condiciones medioambientales que favorezcan su presencia (conservación del ensilado, higiene de la granja, etc.). Existe una correlación entre la alimentación con ensilado y la listeriosis en animales.

En la industria alimentaria es importante desarrollar unas BPH así como la implantación de un sistema APPCC para eliminar la presencia de *L. monocytogenes* y evitar la contaminación de materias primas.

En establecimiento de venta al por menor, es necesario separar los alimentos crudos de origen animal de los alimentos LPC. Limpiar y desinfectar el material que se usa para lonchar y partir los alimentos. Mantener una temperatura adecuada de almacenamiento ($T^{\text{a}} < 4^{\text{a}}\text{C}$) y controlar el de los productos.

La prevención por parte del público, nos lleva a consumir lo antes posible los productos perecederos. Asegurar que la temperatura del frigorífico es $< 5^{\circ}\text{C}$ y por lo tanto la de los alimentos que contiene. Cerciorarse que la temperatura de cocinado es correcta. Efectuar una correcta higiene de manos. No recalentar los alimentos. Separar las carnes no cocinadas de las verduras frescas, alimentos cocinados y alimentos LPC.

1.1.5. Procedimientos de recuento e investigación de *L. monocytogenes* en alimentos

Existen métodos convencionales de recuento e investigación para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de alimentos, que están dentro de la reglamentación internacional como son la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC), la Organización Internacional de Estándares (ISO 11290-1 y 11290-2), el Método del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria del Dpto. de Agricultura de los EE.UU. (FSIS-USDA) y la normativa francesa (NF V 08-55 y XP V 08-062). Dependiendo de la naturaleza del producto, un método particular puede ser más adecuado que otro, siendo el método de la ISO 11290 (partes 1 y 2) el de elección general, los métodos de la FDA y AOAC los recomendados para el análisis de leche y productos lácteos, y la metodología del USDA-FSIS para la carne roja y de ave (cruda o LPC), huevos y derivados y muestras ambientales.

1.1.6. Legislación de *Listeria monocytogenes* relacionada con los alimentos

La legislación que compete a *L. monocytogenes* en alimentos viene establecida en el Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Anónimo, 2005), en la que se establecen los criterios de seguridad alimentaria que marcan la aceptabilidad de un producto o lote de productos. También se citan criterios de higiene de los procesos de producción de alimentos como los valores de contaminación por encima de los cuales, debemos de tomar medidas correctoras. También cita que se debe establecer el muestreo de zonas de trabajo y equipos, cuando sea necesario para garantizar el cumplimiento de los criterios y siempre que se produzcan alimentos LPC que favorezcan el crecimiento de *Listeria*.

En el capítulo I se establecen los criterios de seguridad alimentaria de *Listeria monocytogenes* según la categoría de alimento:

- Alimentos LPC destinados a lactantes y alimentos LPC destinado a usos médicos especiales. En estos alimentos se fija ausencia en 25 g de alimento comercializados durante su periodo de duración mínimo ($n=10$, $c=0$). En este apartado tendremos que tener en cuenta que los productos que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *L. monocytogenes*, y cuando la recontaminación no es posible tras el tratamiento, no se exige realizar análisis regulares.

- Alimentos LPC que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean destinados a lactantes ni usos médicos especiales. En este caso se fijan unos límites de 100 ufc/g en productos comercializados durante su periodo de duración mínimo y ausencia en 25 g de alimento antes de que haya dejado el control inmediato del operador de la empresa alimentaria que lo ha producido ($n=5$, $c=0$, $m=100$ ufc/g, $M=100$ ufc/g).

- Alimentos LPC que no pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, no destinados a lactantes ni a usos médicos especiales. Nos indica 100 ufc/g en productos comercializados durante su periodo de duración mínimo ($n=5$, $c=0$, $m=100$ ufc/g $M=100$ ufc/g). A esta categoría pertenecen los productos con $pH \leq 4$ o $a_w \leq 0,92$, productos con $pH \leq 5$ y $a_w \leq 0,94$, productos con una vida útil < 5 días, cualquier otro producto, siempre que se justifique científicamente.

Siendo: n , número de unidades de que se compone la muestra; c , número de unidades de la muestra cuyo número de bacterias podrá situarse entre m y M ; m , valor umbral del número de bacterias; M , valor límite del número de bacterias.

Otros países tiene una legislación mucho más exigente respecto a *L. monocytogenes*, como es el caso de EEUU, Japón, Canadá que establece tolerancia cero, para este microorganismo.

1.1.7. Antibiorresistencias

1.1.7.1. Historia

El origen de la palabra antibiótico proviene del griego *anti* que significa contra, y *bios* que significa vida. En 1942, Waksman definió antibiótico como “sustancia química derivada o producida por microorganismos que tienen la capacidad, a bajas concentraciones, de inhibir el desarrollo o destruir bacterias u otros microorganismos”.

Desde la antigüedad el ser humano ha utilizado compuestos orgánicos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, como el extracto de algunas plantas y hongos de algunos quesos. En el siglo XIX, el prestigioso francés Louis Pasteur descubrió que algunas bacterias saprofitas podían destruir la bacteria del ántrax. En 1900, el bacteriólogo alemán Rudolf von Emmerich aisló una sustancia que podía destruir los microbios causantes del cólera y la difteria en un tubo de ensayo, pero no pudo aplicarlo en el tratamiento de las enfermedades. Se puede decir que la historia de los antibióticos, como tal, comienza en 1928, cuando el científico británico Alexander Fleming descubrió la penicilina. No hay que olvidar la aportación de Paul Ehrlich a comienzos del siglo XX con el salvarsán para el tratamiento de la sífilis (1909) tal como lo refleja el documento de Uso de Antimicrobianos en animales de consumo (FAO/OMS, 2004).

El término “agente antimicrobiano” engloba tanto a los antibióticos naturales como a los sintéticos, además de a sustancias relacionadas con los antibióticos (antivirales, antimicóticos, agentes quimioterápicos, etc.), por lo que utilizaremos los términos “antimicrobiano” y “antibiótico” indistintamente.

1.1.7.2. Clasificación de los antibióticos

Se conocen más de 15 familias diferentes de antibióticos, con distinta estructura química y mecanismo de acción. Por su modo de acción sobre los microorganismos, podemos dividirlos en dos grandes grupos: I) bactericidas que van a ejercer una acción letal e irreversible sobre el microorganismo y II) bacteriostáticos que inhiben el crecimiento pero no matan al microorganismo.

Como muestra el documento “*The bacterial Challenger: time to react*”, realizado por el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) en colaboración con la Agencia Europea del Medicamento (EMA), el desarrollo de nuevas familias de antimicrobianos desde 1950 a 1960 (cefalosporinas y carbapenemas), supuso un gran avance en medicina humana, ya que se consiguieron controlar enfermedades hasta entonces incurables, y de esta forma favorecer la esperanza de vida. Tras este éxito en medicina humana, se comenzó a utilizar en el tratamiento de enfermedades de animales y plantas, e incluso en industria petroquímica o industria alimentaria.

Actualmente existen varias familias o grupos de antibióticos, entre las que se encuentran los betalactámicos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos, glicopéptidos, clindamicinas, sulfonamidas y trimetoprim, metronidazol, tetraciclinas, rifampicinas, cloranfenicol, fosfomicina y nitrofurantoina.

1.1.7.3. Sensibilidad y resistencia de *Listeria spp* a los antibióticos

En el informe sobre “*Listeria* y listeriosis”, publicado por el SEIMC (1999) se señala que el patrón de sensibilidad a los antibióticos ha permanecido estable con el paso de los años. Este microorganismo es sensible a una amplia gama de antibióticos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicina, cotrimoxazol y vancomicina. Presentan una pobre actividad las fluoroquinolonas actuales y las cefalosporinas, especialmente las de tercera y cuarta generación como cefotaxima y cefepima.

La resistencia a los antibióticos (RAM), fue definida por FAO/OIE/OMS (2008) como la capacidad de un microorganismo de multiplicarse o persistir en presencia de una mayor cantidad de agente antimicrobiano con relación al homólogo susceptible de la misma especie.

Casi todas las cepas de *L. monocytogenes* son resistentes a fosfomicina, oxacilina y lincomisamidas (Comité de L` Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, CASFM, 2010). Se han descrito resistencias a macrólidos y a tetraciclinas en algunos aislamientos, que suelen estar codificadas por plásmidos

El Instituto Pasteur de París y la Agence Française de Sécurité des Aliments (AFSSA) han estudiado la sensibilidad antibiótica de cepas de *L. monocytogenes* de origen alimentario y ambiental aisladas durante 10 años (1996-2006). De las doscientas cepas aisladas, cuatro presentaban fenómenos de resistencia adquirida, dos de ellas resistentes a eritromicina y dos a tetraciclina y minociclina.

1.1.7.4. Problemática de la resistencia antibiótica de *Listeria spp*

Es bien conocida la difusión de resistencias a través de la terapéutica humana y animal, pero desconocemos en qué medida los alimentos de origen animal destinados al consumo humano son portadores de resistencias.

El uso creciente de antibióticos para la salud humana y animal, así como para la producción ganadera, ha sido acompañado del desarrollo de mecanismos de evasión por parte de microorganismos anteriormente sensibles, generando un gran número de cepas microbianas resistentes a antibióticos de uso común. De este modo, desde los años 50 hasta la actualidad no han cesado de crecer las descripciones de microorganismos que han adquirido alguna forma

de resistencia contra uno o más antibióticos. Inicialmente se monitorizó la evolución de las resistencias a antimicrobianos en los aislamientos originados en la clínica humana y posteriormente se dio gran importancia a la necesidad de la monitorización en los aislamientos de origen animal.

Se ha prestado poca atención a la presencia de gérmenes resistentes en los alimentos destinados al consumo humano, especialmente en los de origen animal y que presumiblemente pueden ser portadores de resistencias. (Balsalobre y Hernández-Godoy, 2004).

Los beneficios aportados por el uso de los antibióticos se vieron amenazados por la aparición y propagación de microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos. En el documento “La contención de la resistencia a los antimicrobianos” difundido por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2005), se explica que la aparición de la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural, que surge como resultado del uso de los mismos, pero que está adquiriendo un ritmo acelerado, debido a la utilización inapropiada de estos medicamentos.

Se han detectado dos tipos de resistencia, por un lado la resistencia natural o intrínseca que puede presentarse mediante la interferencia de enzimas inactivadoras, como las mutaciones espontáneas en genes constitutivos de las bacterias; y por otro lado la resistencia adquirida, que puede darse mediante mecanismos de resistencia cromosomiales o extracromosomiales, mediados principalmente por plásmidos.

Debido a todo esto, en el año 2001, la OMS lanzó la primera estrategia mundial de lucha contra los problemas causados por la aparición y propagación de la resistencia a los antibióticos, conocida como “Estrategia mundial OMS de contención de la resistencia a los antimicrobianos”, reconociéndolo como un problema a escala mundial y con intervenciones en todos los puntos, desde consumidores, farmacéuticos, médicos y veterinarios.

1.1.7.5. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antibióticos

El estudio de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología. Los métodos para este estudio pueden clasificarse en métodos cuantitativos y cualitativos. Los métodos cuantitativos son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB).

Se define la CMI como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes). Se define como CMB la mínima concentración de un antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99,9% de una población bacteriana previamente estandarizada. La determinación de la CMI puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o tiras con un gradiente de antibiótico.

Los métodos cualitativos (difusión en disco) son aquellos procedimientos que permiten clasificar a un microorganismo como sensible o resistente. Este es uno de los métodos más utilizados en la práctica diaria.

2. OBJETIVOS

1. La exposición de los seres humanos a *Listeria monocytogenes* se produce fundamentalmente a través de los alimentos. Por tanto, es esencial conocer la prevalencia y el nivel de contaminación de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos tratados térmicamente listos para el consumo adquiridos en el comercio al por menor. Para ello:
 - a. Se ha realizado recuento de *L. monocytogenes*/g.
 - b. Se ha realizado detección de *L. monocytogenes*/25 g.
 - c. Se han utilizado diferentes medios de enriquecimiento (caldo Fraser, caldo ONE-*Listeria* y caldo EB).
2. El pH, la actividad de agua y la temperatura de almacenamiento del producto listo para el consumo influyen significativamente en el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. De modo que:
 - a. Se ha medido el pH en el medio de enriquecimiento EB, mediante tiras indicadoras, en diferentes fases del análisis.
 - b. Se ha medido la actividad de agua en los distintos momentos del análisis.
 - c. Los parámetros anteriores se han medido el día de la compra, a mitad y final del periodo de duración mínima, en almacenamiento a 4°C y 10°C.
3. La enfermedad se considera poco común, a menudo grave y la mortalidad es elevada, de ahí, que se considere de gran importancia el conocimiento de la presentación de antibiotorresistencias en las cepas de *Listeria* spp. Por ello:
 - a. Se estudia la resistencia mediante el procedimiento disco-placa a 20 antibióticos para *L. monocytogenes* y de 25 antibióticos para *L. innocua*.
 - b. En los casos en los que exista dificultad de interpretación del halo de inhibición por su proximidad a los límites, se ha confirmado mediante el procedimiento Epsilon-test (E-test).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1. Medios de cultivo y suplementos

- Caldo Fraser: Fraser Broth Base (CM0895), Oxoid.
 - Suplemento Fraser ½: Half Fraser Selective Supplement (SR0166E), Oxoid.
 - Suplemento Fraser 1/1: Fraser Selective Supplement (SR0156E), Oxoid.
- Caldo ONE-*Listeria*: One Broth-*Listeria* base (CM 1066), Oxoid.
 - Suplemento One: One Broth- *Listeria* Selective Supplement (SR0234E), Oxoid.
- Caldo EB (Anónimo, 1995).
 - TSB: Tryptone Soya Broth (CM0129), Oxoid.
 - Piruvato de sodio: Pyruvic acid sodium salt (1.06619.0050), Merck.
 - Extracto de levadura: Yeast extract granulated for microbiology, (1.03753.0500), Merck.
 - Ácido nalidixico (988780), Sigma-Aldrich.
 - Cicloheximida (44189 4C), VWR.
 - Hidrocloruro de acriflavina (A-8251), Sigma-Aldrich.
- Caldo BHI: Brain Heart Infusion CM1135, Oxoid.
- Agar ALOA: Chromogenic *Listeria* Agar (ISO) Base (CM1084), Oxoid.
 - Brilliance™ *Listeria* Differential Supplement (SR0228E), Oxoid.
 - OCLA (ISO) Selective Supplement (SR0226E), Oxoid.
- Agar Rapid: RAPID´L. *mono* Agar (3555294), Bio-Rad.
- Agar TSA: Tryptone Soya Agar (CM0131), Oxoid.
- Agar Mueller-Hinton (CM0337), Oxoid.
- Agua de peptona tamponada: Peptone water (buffered), acc.to ISO 6579 (1.07228.0500), Merck.
- PCA: Plate Count Agar (CM0325), Oxoid.
- L(+)-Ramnosa monohidratada (27386), VWR.
- D-Xilosa (0181-13-6), Difco laboratories.
- D-Manitol (142067.1210), Panreac.
- Sangre caballo: Sangre desfibrinada de caballo (SR 0050C), Oxoid.
- Galeria API *Listeria* (10300), Biomerieux.
- Discos de antibióticos: Biodisc, Oxoid.

- Tiras M.I.C.E, Oxoid.

3.1.2. Material desechable

- Bolsas Stomacher: VII filter bender bag, FBAG.
- Hojas de bisturi: Carbon steel 0211, Swann-Morton.
- Asas Digralski de plástico estériles (612-1560P), VWR.
- Tiras de pH: Ph-indicator strip Ph 4.0-7.0 (1.09542.0001), Merck.
- Puntas estériles (100-1000 µl).
- Botes toma muestras estériles
- Gradillas, mechero
- Micropipetas: 100-1000 µl Finnipipette, Thermo scientific.
- Asas (10 µl) de nicrom para siembra microbiológica.
- Bolsas Stomacher: VII filter bender bag, FBAG.

3.1.3. Material de metal y de vidrio

- Pinzas, tijeras, mangos bisturi.
- Frascos Pyrex de 100, 250 ml, 500, 1000 ml.
- tubos de ensayo.
- Probetas 225 ml.
- Gradillas.

3.1.4. Mantenimiento de cepas

- Crioviales, Vibackstore S.L.

3.1.5. Equipos:

- Micropipetas (1000µl fija y 100-1000 µl) Finnipipette, Thermofisher Scientific.
- Stomacher® 400 circulator, Seward.
- Espectrofotómetro: Spectronic 20, Bausch & Laumb.
- Rotatubos: TTS2 yellowline, IKA® Works.
- Agitador: Agimatic-N (7000243), JP-Selecta.
- Placa calefactora (1000442), JP-Selecta.
- Balanza: ScoutPro (SP0402), Ohaus Corporation.
- Autoclave: Presoclave 75 L, JP-Selecta.
- Estufa 30º C (2000237), JP-Selecta.

- Estufa 37°C: Memmert D06062.
- Estufa mantenimiento agares 55°C, JP-Selecta.

3.2 Métodos

3.2.1 Muestras analizadas

Se han analizado microbiológicamente varios grupos de productos cárnicos cocido (LPC), con el fin de determinar el recuento de *L. monocytogenes*/g y la detección de *L. monocytogenes*/25 g a lo largo del periodo de duración mínima de los productos.

El número de muestras analizadas de estos productos es de 51 y se presentan envasadas al vacío o en atmósfera protectora (Tabla 5). Los productos se compraron en supermercados de la ciudad de Zaragoza, adquiriéndose cinco envases de cada uno, pertenecientes al mismo lote y con idéntico periodo de duración mínima. Los análisis microbiológicos se realizaron el mismo día de la compra, a mitad del periodo de duración mínima almacenados a 4°C Y 10° C y final de este periodo, almacenadas a las mismas temperaturas.

Desde el momento de la compra de los productos hasta el comienzo del primer análisis no transcurrieron más de 4° C y siempre se conservaron en neveras portátiles con placas congeladoras. A la llegada al laboratorio se distribuyeron las muestras de alimentos a 4°C y 10 °C. Se escoge estas temperaturas de almacenamiento, una porque es la correcta de refrigeración y recomendada por el envase y la de 10° C por ser una temperatura abusiva de refrigeración pero habitual en los refrigeradores domésticos.

Tabla 5: Numero de muestras según el tipo de producto.

Tipo de producto	Nº de muestras	Tipo envase		
		AP	VHP	V
Paleta/Jamón de cerdo	20	10	1	9
Chóped	3	1		2
Mortadela	4			4
Jamón de Pavo	11	8		3
Salchichas	6			6
Otros (Bull blanco, lomo sajonia, lacón asado, cabeza de jabalí, cabeza de cerdo, pate , galantita de pavo)	7	7		
Total	51	26	1	24

Para la elección de los productos cárnicos cocidos, nos hemos basado en la Decisión de la Comisión (2010/75/UE) (Anónimo, 2010), en la que recoge “el programa de seguimiento coordinado de la prevalencia de *L. monocytogenes* en determinados LPC para el consumo en los Estados miembros”, en el Artículo 4, referente a muestreo, análisis y registro de datos por parte de los Estados miembros, los alimentos que incluimos en esta categoría (Anexo I, 1.3 productos cárnicos tratados térmicamente y envasados), son: productos que deben haberse

sometido a tratamiento térmico y, a continuación, deben haberse manipulado y envasado al vacío o en atmósfera modificada. Entre estos productos encontramos los productos cárnicos expuestos y los recubiertos por una envoltura permeable que hayan sido cortados en lonchas o manipulados de otro modo después del tratamiento térmico y antes del envasado. Cabe la posibilidad de que los productos se hayan ahumado después del tratamiento térmico. En esta categoría también se incluyen los productos cárnicos cocidos fríos, tales como los productos cárnicos elaborados normalmente con estructuras anatómicas enteras o partes de ellas (como el jamón cocido en lonchas o el pollo cocido), las salchichas y los patés.

3.2.2. Toma de muestras

Se realiza toma de muestras el día 0 (día de compra) de los 51 productos, a mitad de periodo de duración mínimo de los productos conservados a temperatura de 4º C y de 10ºC y al final del periodo de duración mínimo de los productos a ambas temperaturas.

Bajo condiciones de esterilidad (uso de guantes, mascarilla, gorro y próximo a la llama del mechero bunsen), se toman 3 muestras de 25 g (con bisturí, tijeras y pinzas estériles), y se introducen en bolsas de Stomacher. Posteriormente se añaden 225 ml de los caldos diluyentes y se homogeneizan en Stomacher durante 5 minutos. Finalmente, se devuelven los líquidos homogeneizados a sus frascos iniciales de 225 ml.

3.2.3. Recuento e investigación de *L. monocytogenes*

3.2.3.1. Medios de enriquecimiento

Se han ensayado tres caldos de enriquecimiento diferentes, dos de ellos para el recuento y la investigación de *L. monocytogenes* (caldo Fraser y caldo ONE-*Listeria*) y un tercero sólo para la investigación (caldo EB) (Anónimo, 1995).

3.2.3.2. Enriquecimiento en caldo Fraser

3.2.3.2.1. Recuentos bajos de *L. monocytogenes*

Siguiendo la normativa UNE-EN-ISO 11290-2 para recuentos bajos (2005) (Figura X), y tras haber realizado la toma de muestras en caldo de enriquecimiento Fraser sin suplementos, se deja reposar el enriquecimiento durante una hora, para favorecer la adaptación de la bacteria. A continuación, se realiza la siembra en superficie y se extiende con asa de Drigalski por triplicado de 0,333 ml de enriquecimiento en Agar ALOA. Se lleva a incubación 24-48 horas a 37ºC. Transcurrido este tiempo se realiza el recuento de las placas de agar ALOA.

3.2.3.2.2. Investigación de *L. monocytogenes*

Siguiendo la normativa UNE-EN-ISO 11290-1 (2005), tal como se muestra en la Figura 1 para la detección horizontal de *L. monocytogenes*, y tras realizar el recuento, seguimos con la etapa de enriquecimiento primario en caldo Fraser 1/2.

Se añaden los suplementos selectivos Fraser 1/2, que contienen citrato amónico férrico, ácido nalidíxico y clorhidrato de acriflavina, en cada una de las muestras homogeneizadas y se llevan a incubar durante 24-48 h a 30ºC. Tras 24 h en incubación, se

inoculan 0,1 ml en tubos con 10 ml de caldo Fraser 1/1 incubándolos a 37°C durante 24-48 h (enriquecimiento secundario). Transcurridas las 48 h de incubación de las muestras en caldo Fraser 1/2, se realiza aislamiento en superficie en placas de agar ALOA. Tras las 48 horas se realiza aislamiento en superficie en agar ALOA. Además del aislamiento en placa, se comprueba si se produce ennegrecimiento o no del caldo Fraser 1/2 y caldo Fraser 1/1 tras las 24 o 48 h de incubación.

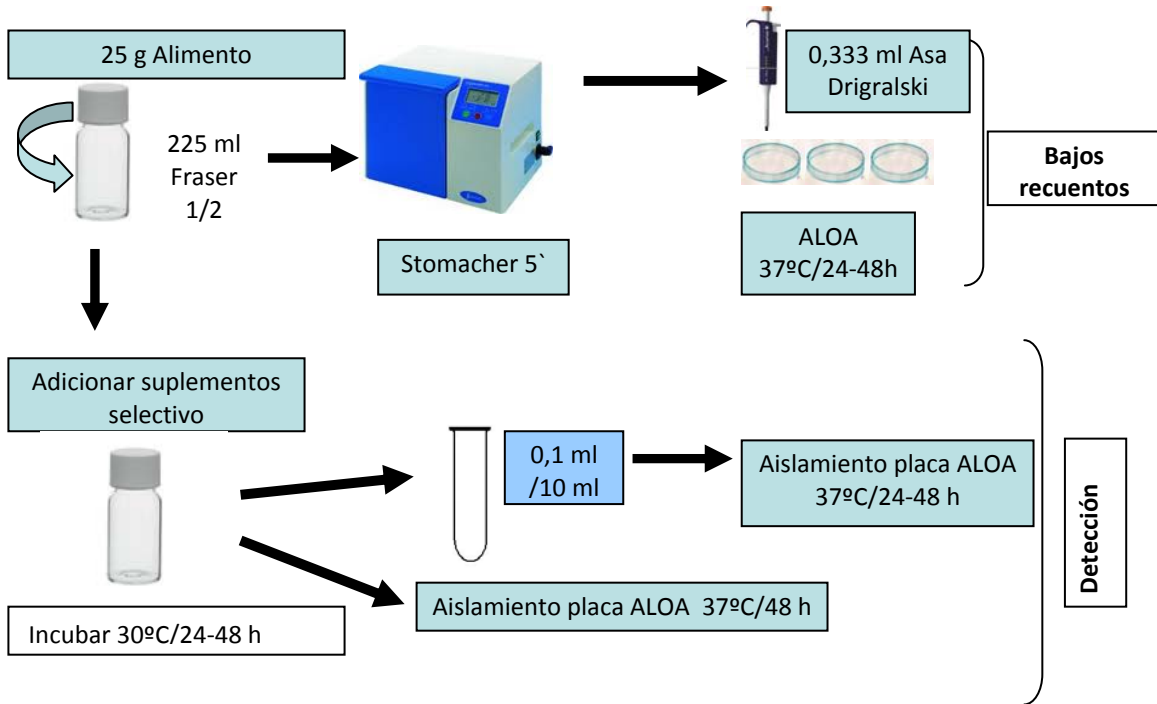


Figura 1: Recuento e investigación *L. monocytogenes* según la ISO 11290 (parte 1 y 2).

3.2.3.3 Enriquecimiento en caldo ONE-*Listeria*

3.2.3.3.1. Recuento de *L. monocytogenes*

Se procede de igual manera que en el apartado 3.2.3.2.1., con la diferencia de que el medio de cultivo utilizado en este caso es el caldo ONE-*Listeria*. El caldo One-*Listeria* es un medio muy nutritivo para la recuperación y crecimiento de *Listeria* spp., a su vez es inhibitorio de microorganismos competentes e incorpora una mezcla equilibrada de peptonas, carbohidratos y sales para la revivificación, recuperación y crecimiento *Listeria* spp. a partir de muestras de alimentos en 24 horas.

3.2.3.3.2. Investigación *L. monocytogenes*

Se sigue la sistemática señalada por el método de cultivo rápido *Listeria* Precis™ validado por la AFNOR (Oxoid, 2010). Tras realizar la toma de muestras, homogeneización y el recuento de *L. monocytogenes*, se añade el suplemento selectivo para caldo ONE-*Listeria* y se incuban los enriquecimientos durante 24 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo se realiza

aislamiento en placas de agar ALOA, llevando posteriormente las placas a incubación durante 24-48 h a 37°C. De nuevo, se comprueba si existe o no ennegrecimiento del medio.

3.2.3.3 Enriquecimiento en caldo EB

En el caso del enriquecimiento de las muestras en caldo EB, solamente se ha realizado investigación de *L. monocytogenes* siguiendo la norma mexicana NOM-143-SSA1-1995 (Anónimo, 1995).

Tras realizar la toma de muestras, se incuban los enriquecimientos en caldo EB (TSB, extracto de levadura 0,6 % y piruvato de sodio al 0,1 % (p/v)), a 30°C durante 24 h. Transcurridas 6 h de incubación se mide el pH del medio de cultivo y posteriormente se adicionan los antibióticos (clorhidrato de acriflavina 15,0 mg, ácido nalidíxico (sal sódica) 40,0 mg y cicloheximida 50,0 mg), en condiciones de esterilidad.

Los suplementos de acriflavina y ác. nalidíxico se preparan a partir de una solución al 0,5 % (p/v) con agua. El suplemento de cicloheximida se prepara como una solución al 1,0 % (p/v) en una solución al 40 % (v/v) de etanol en agua. Todos se esterilizan por filtración. Tras la adición de los antibióticos se incuban las muestras hasta alcanzar las 24 horas, momento en el que se mide nuevamente el pH del medio y se realiza aislamiento en agar ALOA. Se procede de igual forma a las 48 horas de incubación. Las placas se incuban 24-48 h en estufa de 37°C.

3.2.4. Recuento de placas de agar ALOA

El Agar ALOA es un medio de cultivo selectivo y diferencial para el aislamiento de *Listeria* spp. de todo tipo de muestras que permite la identificación específica de *L. monocytogenes*.

Transcurrido el tiempo de incubación de las placas en la estufa a 37°C, se cuentan las colonias características de *L. monocytogenes*, que se caracterizan por ser colonias de borde liso y regular de color verde-azulado y rodeadas por un halo opaco. La selectividad del medio ALOA es producida por el cloruro de litio y los antimicrobianos ceftazidima, polimixina B, ác. nalidixico y cicloheximida. La acción diferencial es debida a la presencia en el medio de un sustrato cromogénico específico el "X-glucosido" que detecta la actividad del enzima β -glucosidasa, común a todas las especies *Listeria*, y que colorea las colonias de azul verdoso. La actividad específica diferencial la aporta el sustrato 4 α -fosfatidilinositol, que en presencia de una fosfolipasa C, presente en *L. monocytogenes*. Da lugar a la formación de un halo opaco alrededor de la colonia verde-azulada (Vlaemynck., 2000).

En la validación del agar ALOA llevada a cabo por la AFNOR, se demostró que tenía una especificidad para la confirmación de *L. monocytogenes* del 100%.

3.2.5. Identificación bioquímica

Dado que agar Aloa diferencia *L. monocytogenes* y no otras especies de *Listeria* y una vez identificadas morfológicamente las colonias, se realiza una emulsión de la colonia en caldo BHI, se homogeniza y se incuba durante 24 h a 37°C. Transcurrido este tiempo se aísla en agar Rapid'*L. mono*, agar selectivo y cromogénico y que diferencia especies (*L. monocytogenes*, *L.*

innocua, *L. ivanovii* y *L. welshimeri*) basándose en la detección específica de la actividad de la PIPLC (fosfatidilinositol fosfolipasa C) y capacidad de esta para metabolizar la xilosa.

Sólo dos especies demuestran actividad PIPLC, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. La adición de xilosa al medio permite la diferenciación de estas dos especies: *L. ivanovii* produce colonias de color gris-azulado con un viraje del medio a color amarillo, basada en su capacidad de metabolizar xilosa, por el contrario *L. monocytogenes* produce colonias gris-azuladas sin viraje del medio, permanece rojo. El resto de especies de *Listeria*, que no presentan actividad PIPLC van a producir colonias de color blanco y además, *L. welshimeri* va a metabolizar la xilosa, produciendo un viraje del medio a color amarillo.

De forma adicional se realiza una preidentificación basada en la fermentación en tubo de tres azúcares (ramnosa, manitol y xilosa) y la evidenciación de β -hemólisis en placas de agar sangre (TSA, extracto de levadura 0,6% y sangre desfibrinada de caballo 7%). Como cepas control para la hemólisis se utilizan *L. monocytogenes* CECT 5366, *L. innocua* CECT 910, *L. ivanovii* CECT 913 y *L. grayi* CECT942,. Tanto los tubos como las placas de agar sangre se llevan a incubar durante 24 h a 37°C

Para llevar a cabo la caracterización bioquímica final de las cepas aisladas de las muestras de productos cárnicos cocidos, se hace uso de las Galerías API *Listeria*, que consisten en un sistema estandarizado para la identificación de *Listeria* que utiliza ensayos miniaturizados, así como una base de datos específica. Consta de 10 microtubos que contienen los sustratos deshidratados y permiten la realización de ensayos enzimáticos o de fermentación de azúcares. Las pruebas que incluye son: DIM (sustrato enzimático para diferenciar *L. innocua* de *L. monocytogenes*), ESC: hidrólisis de la esculina, α -MAN: presencia de α -manosidasa, DARL: acidificación por D-arabitol, XYL: fermentación de la xilosa, RHA: fermentación de la ramnosa, MDG: acidificación de metil- α D-glucopiranosido, RIB: fermentación de la ribosa, G1P: presencia de glucosa 1-fosfato, TAG: presencia de tagatosa.

3.2.6. Medida del pH:

Con la finalidad de comprobar una relación entre el pH y la supervivencia del *L. monocytogenes* en los productos cárnicos LPC a lo largo de su periodo de duración mínimo a 4°C y 10°C y durante su periodo de incubación, se ha medido el pH con tiras reactivas pH-indicator strips. Esta medida se ha realizado en tres fases durante la investigación de *L. monocytogenes* en las muestras preenriquecidas en caldo EB: tras 6 h de incubación (sin suplemento antibiótico), tras 24 h y 48 h de incubación (con suplemento antibiótico).

3.2.7. Medida de la a_w

Se ha llevado a cabo la medida de la actividad de agua mediante el aparato Decagon CX-1, el día de la toma de muestras de todos los productos, día 0, como a mitad y final de su periodo de duración mínimo.

3.2.7.1. Calibración Decagon CX-1: medida a_w

Antes de comenzar las medidas en el Decagón CX-1, se ha llevado a cabo una calibración del aparato. Tal como indica el fabricante, seleccionamos tres soluciones patrón saturadas para calibrar el equipo, una solución de cloruro de sodio (NaCl), otra solución de

dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$), una tercera solución de sulfato de potasio (K_2SO_4) y por último H_2O destilada. De cada una de ellas, se realiza tres medidas para comprobar que las a_w esperadas ($NaCl$: 0,753, $K_2Cr_2O_7$: 0,980 y K_2SO_4 : 0,973) se corresponden con los valores de medida del equipo.

De forma que, tal como se observa en la Tabla 6, tras las 3 replicas de cada una de las soluciones, tenemos una desviación estándar muy pequeña, por lo que el equipo se considera correctamente calibrado.

Tabla 6: Lectura (media \pm desviación estándar) de los patrones de calibración del Decagon CX-1.

	H₂Od (1,000)	K₂Cr₂O₇ (0,980)	K₂SO₄ (0,973)	NaCl (0,753)
	1,007	0,995	0,990	0,752
	1,007	0,992	0,984	0,767
	1,013	0,989	0,986	0,765
MEDIA	1,009	0,992	0,987	0,761
DS	0,0034641	0,003	0,00305505	0,008144528

Para asegurarnos el buen funcionamiento del equipo a lo largo del tiempo de trabajo, cada uno de los días de toma de muestras, se realiza la medida de las soluciones patrón para comprobar el correcto funcionamiento del aparato durante el tiempo de estudio (Tabla 7).

Tabla 7: Lectura (media \pm desviación estándar) de las soluciones patrón durante el tiempo de estudio.

	NaCl (0,753)	K₂SO₄ (0,973)	K₂Cr₂O₇ (0,98)
MEDIA	0,757	0,984	0,992
DS	0,005	0,005	0,005

3.2.8. Antibiograma o test de sensibilidad a los antimicrobianos

3.2.8.1. Calibración del espectrofotómetro

Se ha llevado a cabo la calibración del espectrofotómetro Spectronic 20 para ajustar con la mayor exactitud posible, las indicaciones de medida del instrumento, con los valores que ha de medir. De forma que, tal como indica la Decisión de la comisión del 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (punto 3.1.1.5 Curvas de calibración), se han realizado cinco mediciones de transmitancia de cinco concentraciones de una solución de cromato potásico (CrO_4K_2) en hidróxido potásico (KOH) 0,5 N. De este modo se cumple el requisito de una lectura mínima de cinco niveles de concentración que nos indica la Directiva para la construcción de la curva (Figura 2).

El intervalo de trabajo de la curva es de 0% a 100% de transmitancia, pero el fabricante del aparato recomienda trabajar entre 20% y 80%, ya que si no las lecturas podrían distorsionarse.

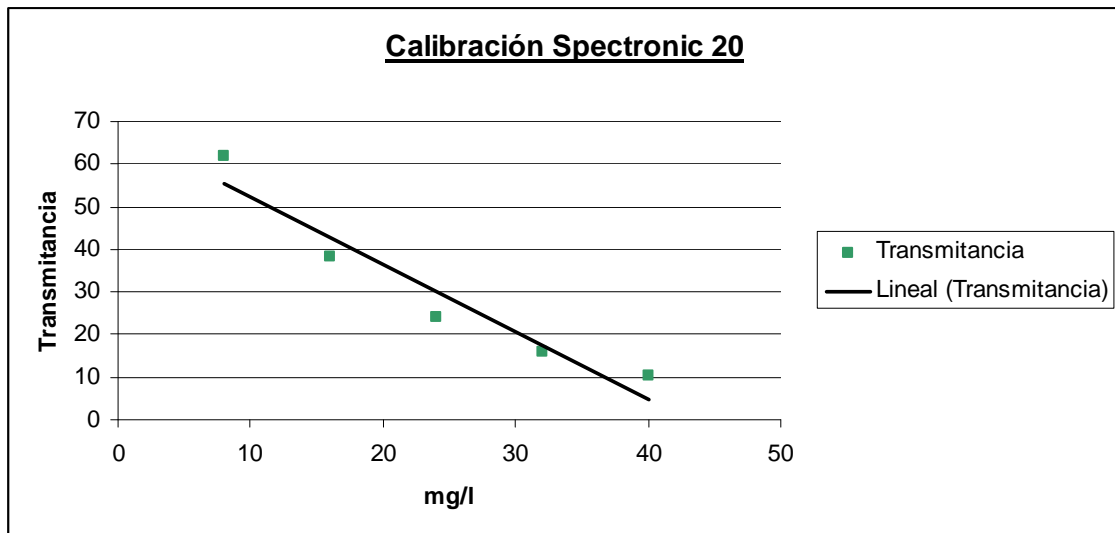


Figura 2: Representación gráfica de la concentración de las soluciones patrón y la lectura de transmitancia obtenida con cada una de ellas.

Tras trazar la línea de tendencia, la ecuación de la recta obtenida es $y = -1,5788x + 67,89$, con un coeficiente de correlación de los datos de 0,9233. De forma que podemos considerar que la calibración del espectrofotómetro es correcta.

3.2.8.2. Curva de crecimiento de *L. monocytogenes*

Con el fin de poder ajustar la concentración de *L. monocytogenes* a un valor conocido, se ha realizado una curva de crecimiento. Para ello se ha preparado una emulsión de una cepa de *L. monocytogenes* aislada de alimento en medio BHI y se han realizado 15 medidas de transmitancia durante su incubación a 37°C con intervalos de 5-15 minutos. A la vez que se realizaban las medidas, se ha sembrado en PCA a partir de las diluciones decimales -6, -7 y -8 por homogeneización en masa. Tras la incubación de las placas durante 24 h a 37°C y la posterior lectura de los recuentos se calcula el logaritmo de la población que corresponde con cada porcentaje de transmitancia. De este modo se construye la curva de crecimiento, representando el porcentaje de transmitancia alcanzado para cada medida frente al log UFC/ml obtenido en el recuento (Figura 3).

La concentración aproximada de *L. monocytogenes* inicial requerida es de $2-5 \times 10^8$ ufc/ml, que se corresponde con los logaritmos 8,3-8,7.

Si representamos el porcentaje de transmitancia en el eje de abscisas y el log UFC/ml en el eje de coordenadas, la ecuación de la recta obtenida es $y = -54,245x + 521,16$. Al sustituir el valor x por el log UFC/ml buscado (8,3-8,7), obtenemos una transmitancia de 50% y 71% respectivamente, rango que nos va a asegurar que en los ensayos obtengamos concentraciones de *L. monocytogenes* de $2-5 \times 10^8$ UFC/ml.

En el caso de *L. innocua* no se ha realizado una curva de crecimiento pero se ha comprobado que ajustando la transmitancia del crecimiento de BHI a 61% mediante 3 réplicas, se obtienen recuentos en PCA de $2-5 \times 10^8$ UFC/ml.

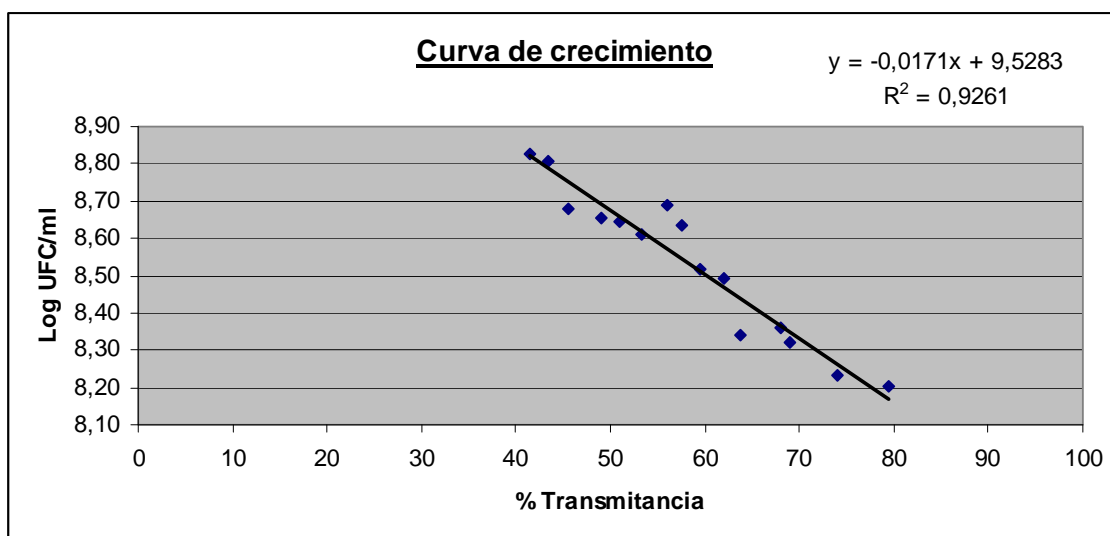


Figura 3: Curva de crecimiento realizada para *L. monocytogenes*.

3.2.8.3. Método de difusión en disco

Se trata de un método cualitativo y se ha llevado a cabo siguiendo el método de referencia para difusión en disco recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio Clínico (CLSI) y el Comité del Antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología (CA-SFM), así como por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST), indicado para bacterias aerobias no exigentes.

3.2.8.3.1. Cepas de los microorganismos control estudiadas

Como control de calidad, por recomendación del CLSI (2006), para evaluar el medio de cultivo Mueller-Hinton en el test de sensibilidad a antimicrobianos, bien por el método E-test o por la técnica de difusión en disco para bacterias Gram +, se han utilizado cuatro cepas de referencia:

-*Escherichia coli* ATCC 25922®: Beta-lactamasa negativa.

-*Staphylococcus aureus* ATCC 25923®: Beta-lactamasa negativa. Para demostrar la calidad del método cuando se realiza sobre bacterias Gram +.

-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853®: para garantiza que el contenido de cationes y el pH sean satisfactorios, en particular para aminoglucósidos.

-*Enterococcus faecalis* ATCC 29212®: susceptible a ampicilina, vancomicina y a nieves altos de aminoglucósidos.

3.2.8.3.2. Cepas *Listeria* spp. estudiadas

Para la realización del estudio de antibiorresistencia se han utilizado 51 cepas de *Listeria* spp., 26 identificadas como a *L. monocytogenes* y 25 como *L. innocua*, aisladas previamente de diferentes grupos alimentos (Tabla 8) y conservadas en crioviales en congelación a una temperatura de -80°C.

Tabla 8: Cepas *Listeria* spp. aisladas de los productos cárnicos LPC en las que se ha estudiado la antibiorresistencia.

Especie (nº)	Grupo Alimento						Total
	Jamón cerdo	Mortadela	Chóped	Jamón pavo	Salchichas	Otros	
<i>L. monocytogenes</i>	16			4		6	26
<i>L. innocua</i>	9		4	2	3	7	25

3.2.8.3.3. Preparación del inóculo

Se ha tomado una bolita del criovial de cada una de las cepas de identificadas, en condiciones de esterilidad, y se ha resuspendido en tubos de ensayo con 5 ml de caldo BHI previamente esterilizado. Se homogeneiza en rotatubos y se introduce en baño con agitación a 37º C durante 12 horas. Posteriormente se homogenizan los tubos y se transfiere un asa a nuevo tubo con 12 ml de caldo BHI, se homogeneiza y se lleva a estufa de incubación a 37ºC durante toda la noche; al mismo tiempo se aísla mediante siembra por agotamiento en TSA suplementado con un 0,6 % de extracto de levadura y se incuban las placas durante 24 h a 37ºC, para comprobar que hay cultivo puro del microorganismo.

3.2.8.3.4. Estandarización del inóculo

Tras las 12 horas de incubación de los tubos de 12 ml de BHI, se procede al ajuste de su transmitancia en tubos de Spectronic a valores aproximados de 61% que asegura obtener recuentos entre $2-5 \times 10^8$ UFC/ml. Para comprobar que el ajuste ha sido correcto, se realiza recuentos de los tubos de Spectronic en PCA mediante homogeneización en masa de 1 ml del inóculo de las diluciones -6 y -7 en agua de peptona al 0,1%. Las placas se incuban durante 24 horas a 37ºC.

3.2.8.3.5. Siembra de las placas de agar Mueller-Hinton

Tras haber ajustado la transmitancia de la cepa, se realiza una dilución decimal en agua de peptona al 0,1%, de modo que se obtiene una concentración de aproximadamente $2-5 \times 10^7$ UFC/ml para contaminar las placas de Mueller-Hinton. Con ayuda de un hisopo empapado en el tubo de dilución, se siembran las placas realizando estrías muy próximas a lo largo de toda la superficie de la placa. Esto se lleva a cabo hasta tres veces girando la placa 60º cada vez, de forma que toda la superficie quede cubierta.

3.2.8.3.6. Colocación los discos de antibióticos.

Tras haber sembrado las placas se colocan los discos de antibióticos con ayuda de un dispensador multicanal (4 o 3 discos por placa). En la Tabla 9 se muestran los 20 antibióticos estudiados para *L. monocytogenes* y *L. innocua* además de los 5 supernumerarios testados para *L. innocua*, ya que según los autores, existen diferencias en la susceptibilidad a ciertos antibióticos para las dos especies de *Listeria*, lo cual es motivo de preocupación dado que *L. innocua* podría transferir sus determinantes de resistencia a la especie patógena (Abuín y col., 1994; Geornaras y Holy, 2001; Yücel y col., 2005). A continuación se incuban las placas durante 24 horas a 37 ºC

Tabla 9: Discos antibióticos estudiados para con las cepas *L. monocytogenes* y *L. innocua*.

Antibiótico	Carga (µg)	Denominación
Amoxicilina-Ác. Clavulánico	30	AMC; 30 µg
Ampicilina	10	AMP; 10 µg
Ciprofloxacino	5	CIP; 5µg
Clindamicina	2	DA;2 µg
Claritromicina	15	CLR; 15 µg
Cloranfenicol	30	C; 30 µg
Gentamicina	10	CN; 10 µg
Imipenem	10	IPM; 10 µg
Levofloxacino	5	LEV; 5 µg
Linezolid	30	LZD; 30 µg
Meropenem	10	MEM; 10 µg
Moxifloxacino	5	MXF; 5 µg
Oxacilina	1	OX; 1 µg
Penicilina G	10	P; 10 µg
Rifampicina	30	RD; 30 µg
Sulfametoxazol-trimetoprim	25	SXT; 25 µg
Teicoplanina	30	TEC; 30 µg
Tetraciclina	30	TE; 30 µg
Tigeciclina	15	TGC; 15 µg
Vancomicina	30	VA; 30 µg
Estreptomina*	10	S; 10 µg
Eritromicina*	15	E; 15 µg
Minociclina*	30	MH; 30µg
Sulfametoxazol*	25	RL; 25 µg
Trimetoprim*	5	W; 5 µg

* Antibióticos supernumerarios para *L. innocua*.

3.2.8.3.7. Lectura de resultados.

Tras las 24 horas de incubación de las placas se realiza la lectura de los recuentos en PCA para comprobar que los porcentajes de transmitancia se corresponden con las concentraciones esperadas de $2-5 \times 10^8$ UFC/ml, así como de los halos de inhibición de las placas de agar Mueller-Hinton.

Para la determinación de la resistencia o sensibilidad de las cepas a cada antibiótico, se mide el diámetro del halo de inhibición con una regla, comprobando que la placa ha tenido un correcto crecimiento bacteriano. El resultado es cualitativo y se expresa como sensible, intermedia o resistente, dependiendo de la medida del halo, como muestra la Figura 4. Si aparecen colonias dentro del halo de inhibición pueden tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, o poblaciones heterogéneas.

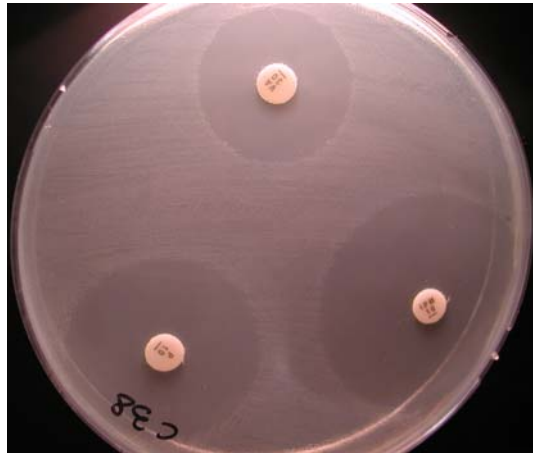


Figura 4: Medida halo inhibición frente al antibiótico en las placas de agar Mueller-Hinton.

3.2.8.3.7. Método Epsilon test (E-test)

En las cepas cuya lectura del resultado en el test de difusión en disco haya causado alguna duda, se ha realizado el E-test para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se ha llevado a cabo siguiendo las recomendaciones de CLSI y el EUCAST. El procedimiento es igual que en el método de difusión en disco pero en vez de depositar los discos de antibióticos con el dispensador multicanal, se colocan las tiras M.I.C.E. con gradiente de antibiótico, aplicando 1-2 tiras en cada placa de agar Mueller-Hinton. Se depositan de forma que la escala CMI este hacia arriba y que la concentración máxima está cercana al extremo de la placa Petri. A continuación, las placas se llevan a incubar durante 24 h a 37°C. Tras la incubación se realiza la lectura de las placas, de forma que se observa una zona de inhibición simétrica y en forma de elipse (Figura 5) donde la CMI es el valor obtenido en el punto que corta el extremo de la elipse de inhibición con la tira de antibiótico.

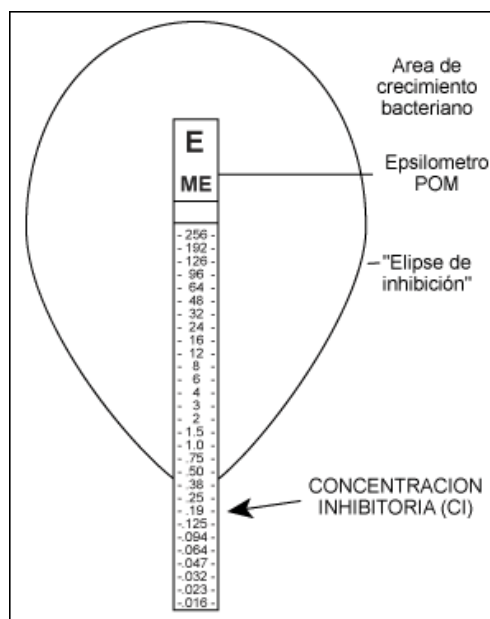


Figura 5: Lectura de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el método del E-test.

4. RESULTADOS

4.1 Recuento y detección de *Listeria* spp. en productos cárnicos cocidos LPC

4.1.1 Recuentos bajos de *L. monocytogenes*

De los 51 productos cárnicos cocidos muestreados analizados el día de la compra, a mitad y a final de su periodo de duración mínima almacenados a 4°C y 10°C, únicamente 3 de las muestras obtuvieron recuento de *L. monocytogenes* (5,9%), perteneciendo todas ellas a la categoría de jamón cocido. Como se puede ver en la Tabla 10, ninguna de ellas presentó recuentos el día de la compra. Una muestra (N12) presentó recuentos a lo largo de todo su periodo de duración mínima almacenada a ambas temperaturas, siendo mayor el número de ufc/g a 10°C. Además, una muestra almacenada a 10°C (N49) presentó recuento a mitad y final del periodo de duración mínima y otra (N17) almacenada a la misma temperatura al final del periodo de duración mínima. Los recuentos oscilaron entre 1,0x10 y 5,9x10² ufc/g.

Tabla 10: Recuentos bajos (ufc/g) de *L. monocytogenes* obtenidos a lo largo del periodo de duración mínima (PDM).

Nº	Tipo de alimento	MPDM4º	MPDM10º	FPDM4º	FPDM10º
N12	Finas lonchas cabeza cerdo	2,9x10 ²	3,3x10 ²	1,0x10 ²	7,0x10 ²
N17	Jamón cocido extra	<10	<10	<10	5,9x10 ²
N49	Jamón cocido extra	<10	1,0x10 ²	<10	1,0x10

MPDM, mitad del periodo de duración mínima; FPDM, final del periodo de duración mínima.

4.1.2 Detección de *Listeria* spp.

Tras la detección de *Listeria* spp. en los tres preenriquecimientos utilizados, a lo largo de su periodo de duración mínima, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Porcentaje de muestras positivas a la detección de *Listeria* spp./25 g por tipo de producto cocido a lo largo de su periodo de duración mínima.

Tipo de producto (nº muestras)	Día 0	MPDM 4ºC	MPDM 10º C	FPDM 4ºC	FPDM 10ºC
Paleta/Jamón cocido (20)	10 (5)	10 (15)	20 (10)	10 (15)	20 (20)
Chóped (3)	0 (0)	0 (33,3)	0 (33,3)	0 (33,3)	0 (33,3)
Mortadela (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Pavo (11)	0 (0)	0 (18,2)	9,1(0)	9,1 (0)	0 (0)
Salchichas (6)	0 (0)	0 (16,7)	0 (0)	0 (33,3)	0 (16,7)
Otros (7)	0 (0)	28,6 (28,6)	28,6 (28,6)	14,3 (14,3)	14,3 (42,9)

(*L. innocua*).

MPDM, mitad del periodo de duración mínima; FPDM, final del periodo de duración mínima.

El día cero, únicamente un 10% de muestras resultaron positivas a la detección de *L. monocytogenes* y un 5% a *L. innocua*, perteneciendo todas ellas al grupo de jamón cocido. A mitad del periodo de duración mínima en los productos almacenando los a 4°C, se obtuvo un 10% de muestras positivas para *L. monocytogenes*, perteneciendo todas ellas a el grupo de jamón cocido y un 28,6 de otros productos (lomo sajonia, cabeza de cerdo, cabeza jabalí, bull,

galantina, lacón asado); para *L. innocua* se obtuvo un 15% en jamón cocido, un 33,3 % en chópéd, un 18% en pavo, un 16,7 % en salchichas y un 28,6 % en otros productos entre los que incluimos cabeza de jabalí, bull, lomo sajonia. A mitad del periodo de duración mínima almacenando los productos a 10°C se obtuvo para *L. monocytogenes* un 20 % de muestras positivas en jamón cocido, un 9,1 % en pavo y un 28,6 % en la categoría de otros productos; para *L. innocua* en las mismas condiciones se obtiene un 10% de muestras positivas en jamón cocido, 33,3 % para chópéd y un 28,6% en la categoría de otros. A final del periodo de duración mínima, a la temperatura de 4°C, se observa un 10% de muestras positivas a la especie patógena en jamón cocido, un 91% para pavo, y un 14,3% para otros productos; siendo para *L. innocua* de un 15% en jamón cocido, un 33,3% en chópéd, un 33,3% en salchichas y un 14,3% en otros. En el mismo periodo, pero con una temperatura de almacenamiento de 10°C, se obtuvo un 20% de muestras positivas a *L. monocytogenes* para jamón cocido y un 14,3% en la categoría de otros, siendo para *L. innocua* de 20% en jamón cocido, 33,3% en chópéd, 16,7% en salchichas y 42,9% en la categoría de otros.

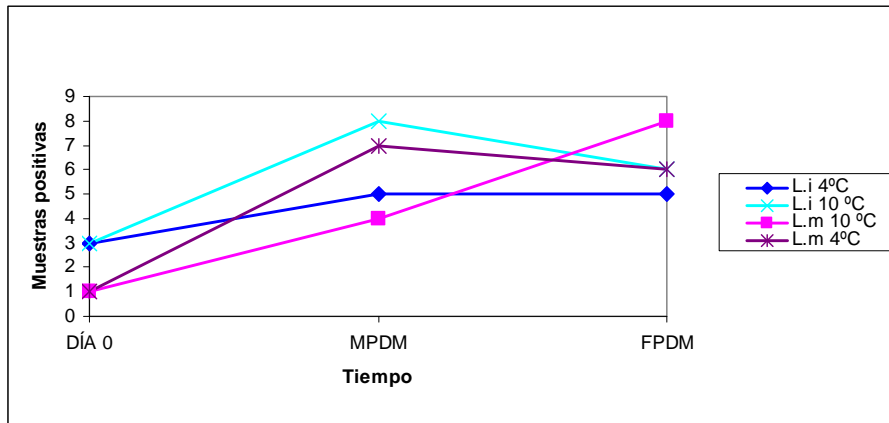
Los tipos de productos cárnicos cocidos que mayor porcentaje de muestras positivas a *L. monocytogenes* han presentado son jamón cocido y la categoría de otros productos, seguidos de los productos de pavo. No se han observado muestras positivas en chópéd, mortadela, ni salchichas.

4.1.3 Evolución de la presencia de *Listeria* spp. a lo largo del periodo de duración mínima.

Todas las muestras de productos cárnicos han sido analizadas después de su almacenamiento a 4°C y 10°C durante su periodo de duración mínima. De forma que como se muestra en la Figura 6, la presencia de *L. monocytogenes*, cuando los productos son almacenados a 4°C, aumenta hasta la mitad del periodo de duración mínima y permanece constante hasta final de éste, comportándose igualmente *L. innocua* a esta temperatura. En el almacenamiento de los productos a 10°C, se produce un incremento de ambas especies hasta mitad del periodo de duración mínima, aumentando la presencia de *L. monocytogenes* hasta el final, mientras que *L. innocua* permanece constante.

Se observa un mayor aumento de la especie patógena, durante el tiempo de conservación, que de *L. innocua*, que se mantiene más estable. Además, se observa mayor número de muestras positivas a mitad del periodo de duración mínima del producto, con excepción *L. monocytogenes*, que tiene mayor número al final cuando los productos han sido almacenados a 10°C.

El Reglamento (CE) Nº 1441/2007 DE LA COMISIÓN de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Anónimo, 2007) señala como criterio microbiológico para el recuento de *L. monocytogenes* en los alimentos LPC que pueden favorecer su desarrollo y que no sean destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales, 100 ufc/g en productos comercializados durante su vida útil. Por la tanto, según nuestros resultados, tres muestras (2 de jamón cocido y 1 de cabeza de cerdo) incumplen este criterio microbiológico al menos en un análisis, llegando hasta cuatro en el caso de la cabeza de cerdo.



MPDM, mitad del periodo de duración mínima; FPDM, final del periodo de duración mínima.

Figura 6: Evolución del número de muestras positivas a la presencia de *Listeria* spp., a lo largo del periodo de duración mínima.

Respecto a la detección de *L. monocytogenes*/25 g, el criterio establece en este tipo de productos, ausencia del microorganismo en 25 g antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido. De modo que, según nuestros resultados, diez muestras no podrían ser comercializadas porque se ha detectado la especie patógena en alguno o diferentes momentos del análisis de los productos a lo largo de su periodo de duración mínima.

Varios estudios han mostrado diferentes incidencias de *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos, todas ellas inferiores a la obtenida en nuestros análisis. 19,6 % positivas a *L. monocytogenes* de las 51 muestras analizadas. Uyttendaele y col. (1999) encontraron un 4,9% de muestras positivas tras analizar 3405 productos cárnicos cocidos. Elson y col. (2004) detectaron una prevalencia menor (2,2%) en 4078 muestras de carne cocida fileteada (2894 muestras) y de patés (1184 muestras). Esta baja prevalencia también ha sido mostrada por Wong y col. (2005) que analizando 300 muestras de patés y 104 de jamón cocido envasado, detectaron 1 muestra con recuento de $1,7 \times 10^3$ ufc/g y un 1% de muestras positivas respectivamente. En dos estudios más recientes han mostrado incidencias de la bacteria patógena en estos mismos productos de 1,1% con recuentos siempre inferiores a 100 ufc/g (Uyttendaele y col., 2009) y de 7,4% (Pérez-Rodríguez y col., 2010).

Cornelius y col. (2008) realizaron un estudio de prevalencia, en Nueva Zelanda, de *Listeria* spp. en 301 muestras de jamón cocido, encontrando la especie patógena en 10 de ellas, y ésta junto a *L. innocua* en 3 muestras. Otros estudios de prevalencia en Nueva Zelanda, llevados a cabo con anterioridad, reportaron un 2,9% de productos de cerdo LPC positivos a la presencia de *L. monocytogenes* (Hudson y col., 1992) y entre un 8%-38% de prevalencia de *Listeria* spp. en productos cárnicos LPC (Hudson y col., 1991). Según los datos proporcionados por el Australian Meat Industry Council y el Health Department of Western Australia, basados en la prevalencia estudiada durante el periodo de 1997-2003, el 4,8% de las muestras de deli meats están contaminadas con *L. monocytogenes* (n = 3351), el 1,2% de patés (n = 568) y el 2,8% de frankfurters (n = 1118) (Ross y col., 2009).

4.2. Preconfirmación y confirmación bioquímica de *Listeria* spp.

A las colonias con morfología típica de *L. monocytogenes* o de *L. innocua* aisladas en agar ALOA (Figura 7) y agar Rapid'*L. mono* (Figura 8), se les realizó unas pruebas bioquímicas preconfirmativas. Estas pruebas consistieron en la fermentación de tres azúcares (ramnosa, xilosa y manitol) y la β -hemólisis.

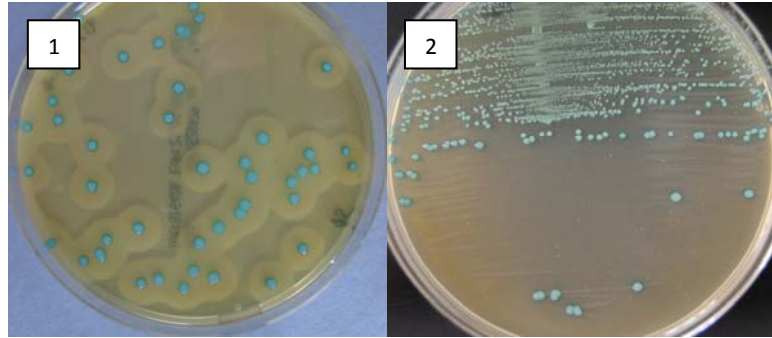


Figura 7: Colonias típicas de *L. monocytogenes* (1) y de *L. innocua* (2) en agar ALOA.

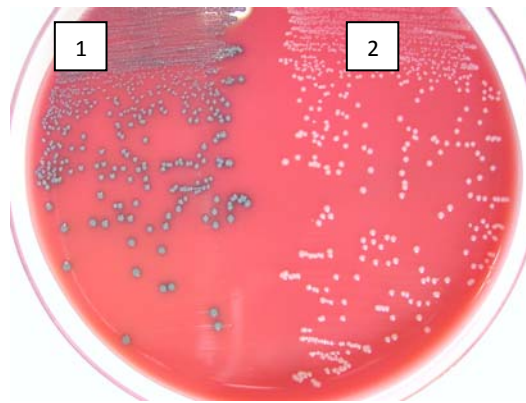
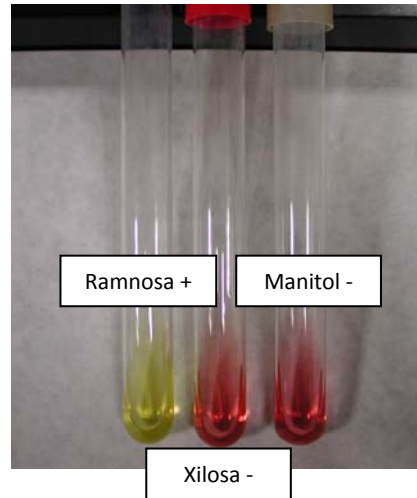
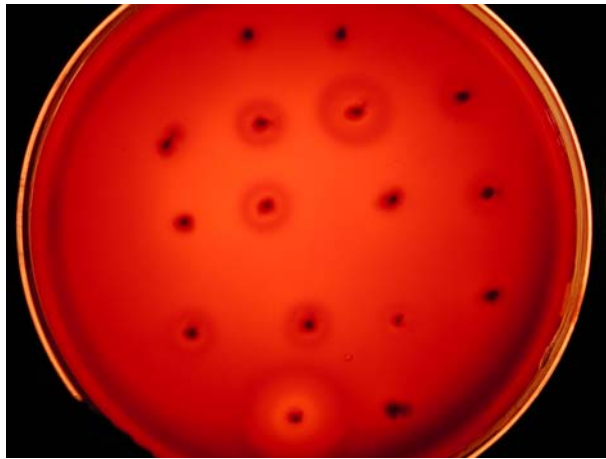


Figura 8: Colonias típicas de *L. monocytogenes* (1) y de *L. innocua* (2) en agar Rapid'*L. mono*.

En la Tabla 12 se muestra la lectura tipo de las pruebas bioquímicas de las cepas utilizadas como control y en la Figura X los resultados de estas pruebas.

Tabla 12: Resultado tipo de las pruebas bioquímicas preconfirmativas de las cepas de *Listeria* utilizadas como control.

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i>
Ramnosa	+	+/-	-	+
Manitol	-	-	-	+
Xilosa	-	-	+	-
β-hemólisis	+	-	+	-



1: *L. monocytogenes*; 2: *L. innocua*; 3: *L. ivanovii*; 4: *L. grayi*.

Figura 9: Resultado de las cuatro pruebas bioquímicas preconfirmativas realizadas.

Además de la preconfirmación, se realizó Galerías API *Listeria* a todas las cepas aisladas de las muestras de productos cocidos y a las cepas de utilizadas como control (Figura 10).

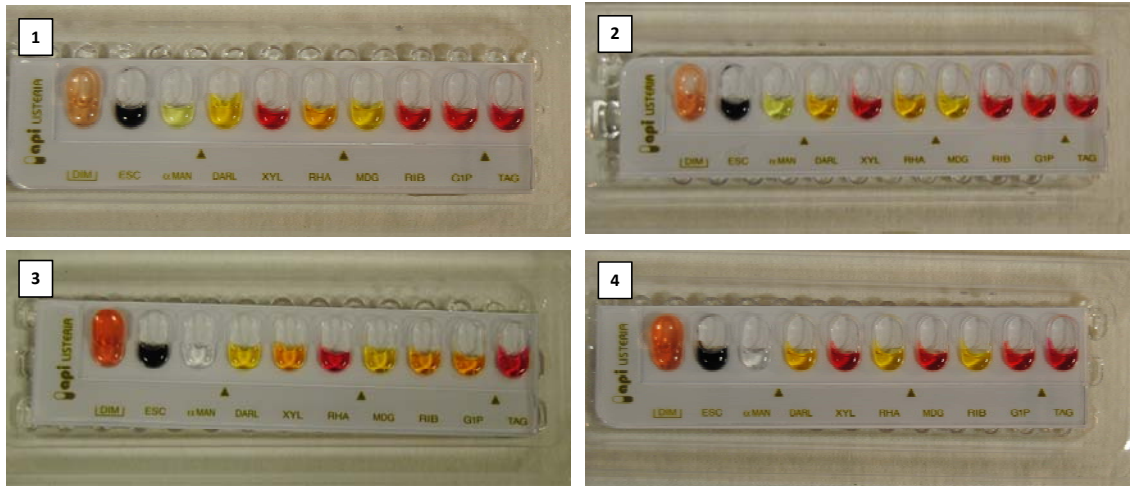


Figura 10: Galerías API *Listeria* de *L. monocytogenes* (1), *L. innocua* (2), *L. ivanovii* (3) y *L. grayi* (4).

Se ha confirmado, por lo tanto, en todas las cepas la especie que nos indicaba el aislamiento en placa, obteniendo finalmente 26 cepas de *L. monocytogenes* y 25 de *L. innocua*.

4.3. Medida del pH y de la actividad de agua

4.3.1. Actividad de agua

Tras la medida de la a_w de todos los productos en la toma de muestras a lo largo de su periodo de duración mínima observamos en la Tabla 13, que el día 0 el grupo con mayor actividad de agua es el de jamón cocido ($0,996 \pm 0,009$) y el de menor el grupo de las salchichas

(0,985±0,009); tanto a mitad como al final del periodo de duración mínima en almacenamiento a 4°C, el grupo de otros productos presenta la mayor actividad de agua y las salchichas, nuevamente, el que menor. En el almacenamiento a 10 °C, a mitad del periodo de duración mínima, el grupo que presenta mayor a_w fue la mortadela (0,996±0,010) y el de menor las salchichas, mientras que al final del periodo de duración mínima fue el grupo de jamón cocido el de mayor actividad (0,991±0,006) y nuevamente el grupo salchichas (0,974±0,010) el que menor.

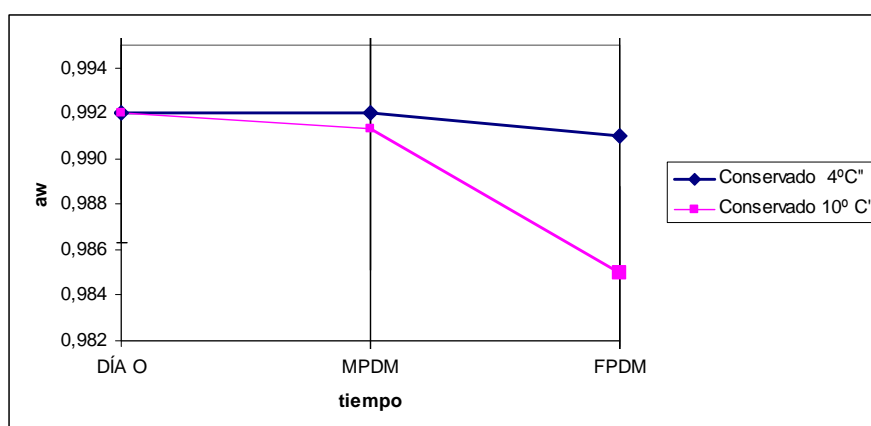
Las medias de las a_w de todos los tipos de productos oscilan entre 0,974-0,999, rango de actividad adecuado para el crecimiento de *Listeria* spp.

Tabla 13: Evolución de a_w por tipo de producto en el análisis durante el periodo de duración mínima almacenados a 4°C y 10°C.

a_w	Día 0	MPDM 4°C	MPDM 10°C	FPDM 4°C	FPDM10°C
Paleta/jamón cocido	0,996±0,009	0,993±0,007	0,992±0,002	0,992±0,005	0,991±0,006
Chóped	0,994±0,006	0,985±0,011	0,990±0,014	0,990±0,011	0,989±0,008
Mortadela	0,993±0,003	0,997±0,009	0,996±0,010	0,992±0,007	0,990±0,008
Salchichas	0,985±0,009	0,984±0,007	0,985±0,010	0,985±0,009	0,974±0,010
Pavo	0,991±0,005	0,994±0,009	0,994±0,011	0,994±0,012	0,988±0,010
Otros	0,992±0,011	0,999±0,009	0,991±0,007	0,996±0,012	0,990±0,006

MPDM, mitad del periodo de duración mínima; FPDM, final del periodo de duración mínima.

Como se muestras en la Figura 11, la evolución de la a_w en función de la temperatura de almacenamiento del producto, sigue una tendencia diferente. Observándose que a 4°C, se encuentra prácticamente estable a lo largo de su periodo de duración mínima; mientras que a la temperatura de 10°C, se observa un pequeño descenso a final del periodo de duración mínima.



MPDM, mitad del periodo de duración mínima; FPDM, final del periodo de duración mínima.

Figura 11: Evolución de a_w en función de la temperatura de almacenamiento.

4.3.2. Medida del pH del enriquecimiento en el medio EB.

Teniendo en cuenta la similitud en la composición de los medios utilizados en el estudio, hemos elegido el medio EB para comprobar la variación de pH en el enriquecimiento (25g de producto +225ml de medio EB) tras 6 h de incubación (sin suplemento antibiótico) y 24h y 48h (con suplemento antibiótico) a 30º C.

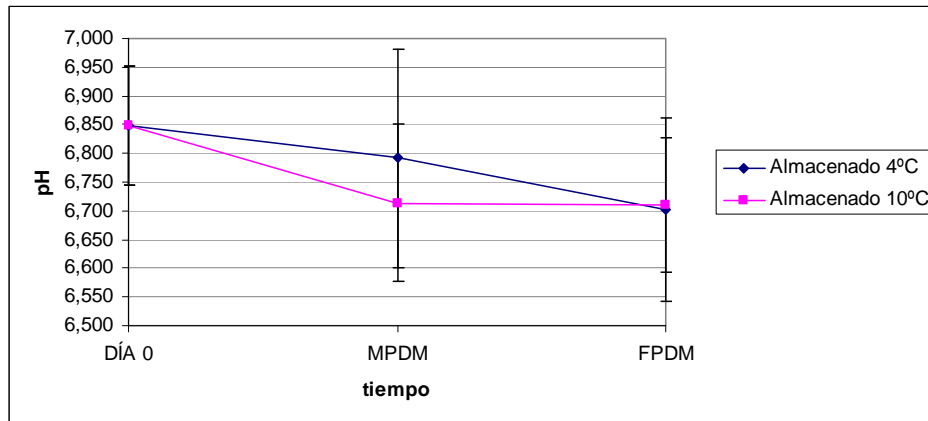
Se ha medido el pH a las 6, 24 y 48 h de incubación de todas las muestras enriquecidas en caldo EB, a lo largo de su periodo de duración mínima. En la Tabla 14, se muestran los resultados de la medida a las 6 horas de incubación. Se reflejan muy pocas diferencias entre grupos de alimentos, al igual que durante el paso de tiempo de almacenamiento; oscilando los pHs el día 0 entre 6,67-6,95, a mitad del periodo de duración mínima a 4º C de 6,5 a 6,97, a 10ºC de 6,57 a 6,95 y al final del periodo de duración mínima variaron entre 6,45 a 6,92 en los productos almacenados a 4ºC, y entre 6,60 a 6,86 a 10ºC. La categoría de otros productos son los que muestran un pH más ácido y el grupo de la mortadela el más alto, estando todos ellos dentro del intervalo de pH favorable para el crecimiento de *Listeria* spp.

Tabla 14: Evolución del pH por tipo de alimento tras 6 h de incubación en caldo EB a lo largo del periodo de duración mínima.

Grupo alimento	Día 0	MPDM 4º C	MPDM 10ºC	FPDM 4ºC	FPDMV 10ºC
Paleta/jamón cocido	6,95±0,23	6,86±0,25	6,685±0,40	6,72±0,40	6,67±0,43
Chóped	6,83±0,47	6,73±0,40	6,6±0,36	6,8±0,36	6,86±0,35
Mortadela	6,8±0,46	6,97±0,33	6,95±0,49	6,92±0,53	6,85±0,44
Salchichas	6,91±0,60	6,68±0,57	6,76±0,68	6,45±0,54	6,6±0,56
Pavo	6,91±0,32	7±0,36	6,70±0,71	6,66±0,35	6,61±0,32
Otros	6,67±0,53	6,5±0,26	6,57±0,33	6,65±0,28	6,65±0,21

MPDM, mitad del periodo de duración mínima; FPDM, final del periodo de duración mínima.

Respecto a la evolución del pH de los enriquecimientos en EB a lo largo del periodo de duración mínima y diferente temperatura de almacenamiento, se puede observar en la Figura 12 que durante el almacenamiento a 4ºC, el pH disminuye gradualmente hasta el final 15 décimas; mientras que a 10ºC se produce el descenso de una 0,15 unidad de pH a mitad del periodo de duración mínima, manteniéndose constante hasta el final, y oscilando en todos los casos entre 6,85 y 6,71.



MPDM, mitad del periodo de duración mínima; FPDM, final del periodo de duración mínima.

Figura 12: Evolución del pH del enriquecimiento en EB en función del tiempo y temperatura de almacenamiento.

Durante la incubación del medio de enriquecimiento para la detección de *L. monocytogenes* el pH va disminuyendo a lo largo de las 48 horas. Tal como se muestra en la Figura 13, se produce una reducción de pH de 1,5 unidades, bajando de 6,8 a 5,3, observándose esta tendencia en ambas temperaturas de almacenamiento y en todos los puntos de muestreo, debido a la multiplicación de la flora ácido láctica.

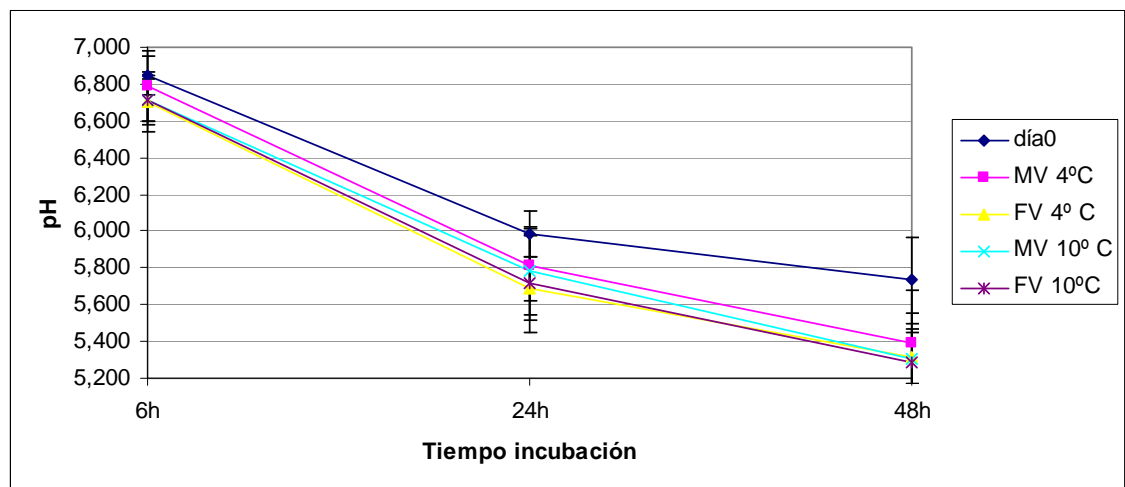


Figura 13: Evolución del pH durante en tiempo de incubación de las muestras enriquecidas en caldo EB.

4.4. Análisis estadístico de los resultados

4.4.1. Relación de los tres procedimientos de enriquecimiento en la detección de *Listeria* spp.

Se ha aplicado el análisis estadístico de Chi-cuadrado a los datos obtenidos en los resultados de la relación de muestras positivas y negativas obtenidos con los tres métodos de

enriquecimiento. Los resultado se expresan como la efectividad del método de enriquecimiento en la detección de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y de ambas especies en conjunto.

En la detección de *L. monocytogenes* en caldo Fraser frente a caldo ONE-*Listeria*, se obtuvieron 9 resultados positivos en caldo Fraser que en caldo ONE-*Listeria* mostraron resultado negativo; solo 3 análisis positivos que se aislaron mediante caldo ONE-*Listeria*, no fueron identificados como positivos mediante caldo Fraser y 10 positivos fueron coincidentes con los dos medios (Tabla 15).

Si comparamos el caldo Fraser con el caldo EB, 17 resultados positivos aislados mediante caldo Fraser, fueron negativos mediante caldo EB; 2 análisis positivos fueron coincidentes en ambos medios y un análisis positivo en caldo EB, no lo fue en Fraser.

Por último, si tenemos en cuenta los resultados obtenidos en caldo ONE-*Listeria* y en caldo EB, 11 análisis resultaron positivos con caldo ONE-*Listeria* y negativos en caldo EB, 2 resultados fueron coincidentes y solo un resultado fue positivo mediante caldo EB, dando negativo en caldo ONE-*Listeria*.

En todos los casos se han observado diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre el caldo Fraser frente al caldo ONE-*Listeria* y al caldo EB, siendo mayor el número de análisis positivos con el primer enriquecimiento. Por lo tanto, podemos afirmar que se producen mayor número de aislamientos positivos en caldo Fraser, que en los otros dos medios utilizados, dándole a éste mayor validez para la detección de *L. monocytogenes*. Es importante señalar que también existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el caldo ONE-*Listeria* y el caldo EB, siendo mayor el número de análisis positivos en el primero.

Tabla 15: Tabla de contingencia de los resultados obtenidos en caldo Fraser, caldo ONE-*Listeria* y Caldo EB en la detección de *L. monocytogenes*.

<i>L. monocytogenes</i>		ONE		Total
		-	+	
FRASER	-	233	3	236
	+	9	10	19
Total		242	13	255
		EB		Total
		-	+	
FRASER	-	235	1	236
	+	17	2	19
Total		252	3	255
		EB		Total
		-	+	
ONE	-	241	1	242
	+	11	2	13
Total		252	3	255

Para *L. innocua* y para las dos especies en conjunto, se obtienen resultados muy similares a los obtenidos para *L. monocytogenes*, que son significativamente mayores los resultados en caldo Fraser que en los otros dos enriquecimientos. A su vez, el número de positivos en caldo ONE-

Listeria ha sido superior que en caldo EB presentando diferencias significativas ($p < 0,05$), como se muestra en la Tabla 16 para *L. innocua*, y en la Tabla 17 para *Listeria* spp.

Tabla 16: Tabla de contingencia de los resultados obtenidos en caldo Fraser, caldo ONE-*Listeria* y Caldo EB en la detección de *L. innocua*.

<i>L. innocua</i>		ONE		Total
		-	+	
FRASER	-	225	1	226
	+	20	9	29
Total		245	10	255
		EB		Total
		-	+	
FRASER	-	225	1	226
	+	24	5	29
Total		249	6	255
		EB		Total
		-	+	
ONE	-	243	2	245
	+	6	4	10
Total		249	6	255

Tabla 17: Tabla de contingencia de los resultados obtenidos en caldo Fraser, caldo ONE-*Listeria* y Caldo EB en la detección de *Listeria* spp.

<i>Listeria</i> spp.		ONE		Total
		-	+	
FRASER	-	211	1	212
	+	22	21	43
Total		233	22	255
		EB		Total
		-	+	
FRASER	-	212	0	212
	+	35	8	43
Total		247	8	255
		EB		Total
		-	+	
ONE	-	233	0	233
	+	14	8	22
Total		247	8	255

4.4.2 Influencia del tiempo de almacenamiento del producto

Tras aplicar el análisis estadístico de Chi-cuadrado a los resultados de las especie patógena de *Listeria*, se observa que es significativamente mayor ($p < 0,05$) el número de muestras positivas al final del periodo de duración mínima que en la mitad de dicho periodo. Esta tendencia no se mantiene para *L. innocua* ni para las dos especies en conjunto (Tabla 18), obteniendo 14 y 20 resultados positivos a mitad y final del periodo de duración mínima,

respectivamente. Se observan diferencias estadísticas ($p < 0,05$) a pesar de que el número de análisis positivos es el mismo en ambos periodos de análisis.

Tabla 18: Tabla de contingencia de los resultados obtenidos, según el periodo de almacenamiento, en la detección de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *Listeria spp.*

<i>L. monocytogenes</i>		FPDM		Total
		-	+	
MPDM	-	87	6	93
	+	5	4	9
Total		92	10	102
<i>L. innocua</i>		FPDM		Total
		-	+	
MPDM	-	80	8	88
	+	8	6	14
Total		88	14	102
<i>Listeria spp.</i>		FPDM		Total
		-	+	
MPDM	-	72	10	82
	+	10	10	20
Total		82	20	102

4.4.3 Influencia de la temperatura de almacenamiento del producto

Al observar la influencia de la temperatura de almacenamiento, se comprueba que es significativamente mayor el número de análisis positivos en los productos mantenidos a 10°C que a 4°C, sin tener en cuenta el tiempo de almacenamiento, para *L. monocytogenes* (Tabla 19). Pero en el caso de *L. innocua* y *Listeria spp.*, el total de análisis positivos a 4°C ha sido mayor que a 10°C, mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 19: Tabla de contingencia de los resultados obtenidos, según la temperatura de almacenamiento, en la detección de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *Listeria spp.*

<i>L. monocytogenes</i>		10°C		Total
		-	+	
4°C	-	87	8	95
	+	3	4	7
Total		90	12	102
<i>L. innocua</i>		10°C		Total
		-	+	
4°C	-	83	3	86
	+	7	9	16
Total		90	12	102
<i>Listeria spp.</i>		10°C		Total
		-	+	
4°C	-	84	5	89
	+	6	7	13
Total		90	12	102

4.4.4. Influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento

Son significativamente mayores ($p < 0,05$) el número de resultados positivos para *L. monocytogenes* a mitad y final del periodo de duración mínima en almacenamiento a 10°C, que el día 0, al igual que es significativo el mayor número de muestras al final que a mitad para esta temperatura.

Además, se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los resultados positivos a mitad del periodo de duración mínima entre 4°C y 10°C, siendo mayores en esta última temperatura. Esto mismo se repite al final del periodo de duración mínima, en la que se obtienen mayor número de resultados positivos en almacenamiento a 10°C.

Para *L. innocua* son significativas las diferencias ($p < 0,05$) entre el almacenamiento a 4°C y 10°C, siendo mayores los resultados positivos a mitad del periodo de duración mínima a temperaturas de almacenamiento del producto de 4°C; y se han obtenido el mismo número de análisis positivos a ambas temperaturas al final del periodo de duración mínima.

Para las dos especies en conjunto, si existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambas temperaturas de almacenamiento en los análisis a la mitad y final del periodo de duración mínima. Además se observan diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre los resultados positivos a la mitad y final del periodo de duración mínima almacenadas a 10°C, siendo mayor el número de análisis positivos al final del periodo.

4.4.5 Relación del ennegrecimiento del medio de enriquecimiento con la presencia de *Listeria spp.*

Las especies del género *Listeria* son esculina positivas. Esta actividad se debe a la acción del enzima metabólico β -glucosidasa que reduce la esculina a 6,7-dihidroxycoumarina (esculetina) dando lugar a una coloración parda a negra del medio en presencia de citrato férrico. Una de las características del medio selectivo caldo Fraser y caldo ONE-*Listeria* es evidenciar este ennegrecimiento. Al comparar el caldo Fraser media concentración frente al caldo Fraser concentración normal (Tabla 20) se observa que en el primero existe un menor porcentaje de muestras que resultaron positivas a la presencia de *Listeria spp.* y no mostraron ennegrecimiento, mientras que es mucho mayor el porcentaje de muestras que si presentaron ennegrecimiento y no resultaron positivas en la detección. En cualquier caso, estos altos porcentajes en ambos enriquecimientos muestran que el ennegrecimiento o no del medio no es determinante para dar un resultado de positividad o negatividad a la presencia de *Listeria spp.*

Una posible explicación de este comportamiento de los medios de enriquecimiento podría ser que el caldo Fraser a media concentración actúe muy selectivamente eliminando durante su incubación el resto de microbiota presente en la muestra. De esta manera, al inocular el medio Fraser a concentración normal, solamente crecería *Listeria spp.* en el caso de estar presente en la muestra. Rodrigues y col. (1995) encontraron un elevado porcentaje de muestras de queso enriquecidas secundariamente en caldo Fraser en las que se observaba ennegrecimiento del medio pero no se detectó *Listeria spp.* (59.4%). Sugieren que puede ser debido a la presencia de otros microorganismos capaces de hidrolizar la esculina y que son más resistentes que *Listeria spp.* al efecto conservador de los quesos.

Tabla 20: Porcentaje del número muestras analizadas según el resultado microbiológico y el ennegrecimiento negativo o positivo del caldo Fraser.

	Fraser 1/2					Fraser 1/1				
	E+/R+	E-/R+	E+/R-	E-/R-	Total	E+/R+	E-/R+	E+/R-	E-/R-	Total
Alimento DÍA 0	7,8	0,0	19,6	72,5	100	5,9	2,0	5,9	86,3	100
Alimento MPDM 4°C	21,6	3,9	31,4	43,1	100	17,6	7,8	11,8	62,7	100
Alimento MPDM 10°C	25,5	0,0	25,5	49,0	100	19,6	5,9	5,9	68,6	100
Alimento FPDM 4°C	17,6	2,0	45,1	35,3	100	13,7	5,9	13,7	66,7	100
Alimento FPDM 10°C	19,6	2,0	39,2	39,2	100	17,6	3,9	11,8	66,7	100

(E+) ennegrecimiento +, (E-) ennegrecimiento -, (R+) resultado +, (R-) resultado -.
MPDM, mitad del periodo de duración mínima; FPDM, final del periodo de duración mínima.

En el caso del caldo ONE-*Listeria* (Tabla 21), el porcentaje de análisis en los que se ha detectado *Listeria* spp. y que no mostraron ennegrecimiento del medio es muy bajo. No ocurre lo mismo en los análisis que resultaron negativos en la detección y que si mostraron ennegrecimiento, aunque estos porcentajes son inferiores a los obtenidos en caldo Fraser media concentración.

Tabla 21: Relación del número muestras analizadas según el resultado microbiológico y el ennegrecimiento negativo o positivo del caldo ONE-*Listeria*.

	Caldo ONE- <i>Listeria</i>				
	E+/R+	E-/R+	E+/R-	E-/R-	Total
Alimento DÍA 0	3,9	0,0	9,8	86,3	100
Alimento MPDM 4°C	11,8	0,0	27,5	60,8	100
Alimento MPDM 10°C	5,9	0,0	21,6	72,5	100
Alimento FPDM 4°C	9,8	0,0	33,3	56,9	100
Alimento FPDM 10°C	9,8	2,0	29,4	58,8	100

(E+) ennegrecimiento +, (E-) ennegrecimiento -, (R+) resultado +, (R-) resultado -.
MPDM, mitad del periodo de duración mínima; FPDM, final del periodo de duración mínima.

4.5 Resultado del estudio de antibiorresistencia a las cepas de *Listeria* spp.

4.5.1. Determinación del inóculo de siembra para la realización del antibiograma

Se ha estudiado la antibiorresistencia de 26 cepas de *L. monocytogenes* y 25 de *L. innocua*. Tras realizar el ajuste de la transmitancia en el aparato Spectronic 20 y realizar el recuento en PCA, todas las cepas estudiadas alcanzaron el crecimiento requerido ($2,5 \times 10^8$ ufc/ml), encontrándose en todos los casos, a excepción de una cepa de *L. monocytogenes*, entre 8,3 y 8,7 log ufc/ml (Figura 14 y 15).

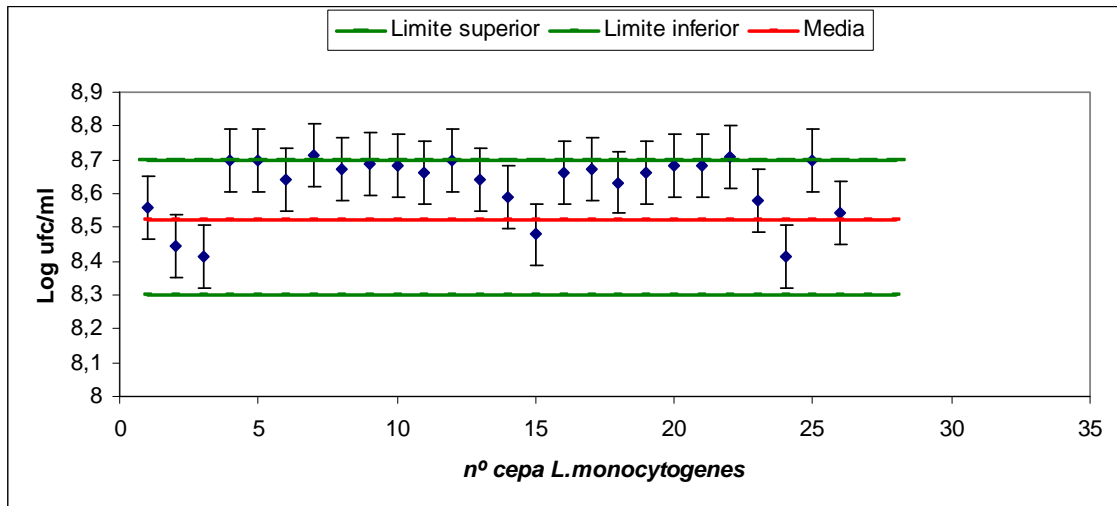


Figura 14: Representación de los recuentos \pm desviación estándar de las cepas de *L. monocytogenes* obtenidos tras el ajuste de la transmitancia.

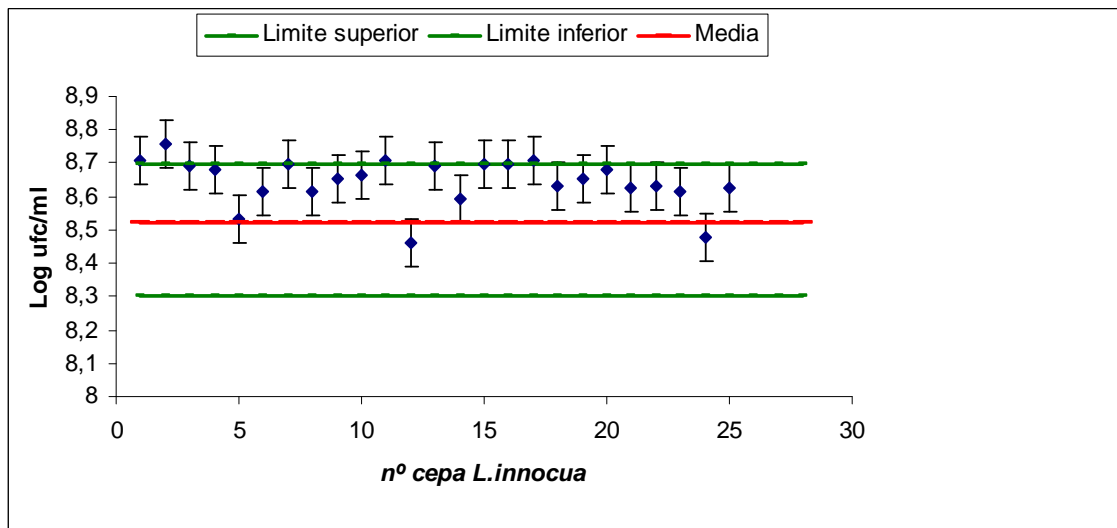


Figura 15: Representación de los recuentos \pm desviación estándar de las cepas de *L. innocua* obtenidos tras el ajuste de la transmitancia.

Los recuentos de las cepas de referencia estudiadas (Tabla 22), se encuentran, igualmente, dentro del intervalo establecido.

Tabla 22: Recuentos obtenidos en PCA de las cepas referencia tras el ajuste de la transmitancia.

	Log ufc/ml
<i>E. coli</i>	8,5
<i>E. faecalis</i>	8,3
<i>P. aeruginosa</i>	8,7
<i>S. aureus</i>	8,3

4.5.2. Control de calidad de las cepas de referencia

Los resultados del control de calidad de las cepas de referencia se compararon con los estándares de el Comité del Antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología (CA-SFM) del año 2010, con los de la Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana (BSAC) y con las recomendaciones para control de calidad interno del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST), que, pese a no ser coincidentes, si son similares (Tabla 23).

Tablas 23: Límites de los diámetros de inhibición (mm), de las cepas de referencia obtenidos por difusión en agar.

Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Amoxicilina/clavulánico	23 (22-27)			
Ampicilina	18(16-22)			30(26-35)
Ciprofloxacino	37(31-38)	28(29-36,5)		26(21-27)
Claritromicina				
Clindamicina			30(26-33)	
Cloranfenicol	26 (21-27)			27(20-26)
Gentamicina	23 (22-26,5)	20(22-28)	27(24-28,5)	13(12-18)
Imipenem	33(33-37)	26(24,5-29,5)		29(28-32)
Levofloxacino	33(29-37)	24(23-29)		
Linezolid				
Meropenem	35(28-34)	33(32-39)		24(22-28)
Moxifloxacino	33(28-35)			28(22-28)
Oxacilina			26(27-34)	
Penicilina G			38(31-38,5)	
Rifampicina			40(34-39)	
Sulfametoxazol-trimetoprim	30(25,5-30,5)		36(28-32,5)	
Teicoplanina			20(17-20)	19(19-25)
Tetraciclina	25(18-25)			
Tigeciclina	24(20-27)			24(20-26)
Vancomicina			20(17,5-20,5)	20(13-19)

Como se ve en la Tabla 23, para algunos antibióticos, los valores registrados de diámetro de inhibición (mm) no están dentro del intervalo establecido. Ello puede deberse a la poca estandarización de los discos, como se refleja en el trabajo de (Obregón y Zavaleta, 2006) sobre control de calidad de discos de sensibilidad antimicrobiana de diferentes marcas

comercializadas en Perú, que también hacen en España, presentando incidencias elevadas de no conformidad de incluso un 71,4%.

4.5.3. Resultados de los antibiogramas de las cepas de *L. monocytogenes* y *L. innocua*

Teniendo en cuenta las recomendaciones del Comité de Expertos de Estandarización biológica de la OMS (documento nº 610,1977), se formaron diferentes comités, cuyo fin es determinar la sensibilidad a los antimicrobianos, para intentar determinar los valores críticos que delimitan unas categorías clínicas. Entre ellos se encuentran CA-SFM y la BSAC ambos componentes del EUCAST o el CLSI, que actualizan los valores críticos definidos para las concentraciones y los diámetros de inhibición de cada grupo o especie bacteriana.

En Europa en 2002, se creó el EUCAST para intentar armonizar los criterios metodológicos y de interpretación de los test de sensibilidad a los antibióticos.

Los resultados de este trabajo, obtenidos tras medir el halo de inhibición, se interpretan comparándolos con los criterios establecidos por el CA-SFM. Estos resultados son cualitativos y se clasifican, según su punto de corte, de la manera siguiente:

- **Sensible**, refiriéndose a que la posible infección ocasionada por la cepa para la que se determina la CMI podría tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales de antibiótico.

- **Intermedio**, el valor de CMI se aproxima a las concentraciones de antimicrobiano alcanzables en sangre o tejidos y que puede esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones en las que se alcanzan altas concentraciones o cuando se emplean dosis más altas de lo habitual.

- **Resistente**, se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos, o aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencia específicos para el agente estudiado y no ha habido una adecuada respuesta cuando se ha usado como tratamiento el correspondiente antimicrobiano.

4.5.3.1. Método de difusión en disco

El diámetro de la zona de inhibición (mm) es inversamente proporcional a la concentración mínima inhibitoria. En la Tabla 24 se muestran los antibióticos estudiados con la abreviatura y carga de antibiótico así como el rango (mm) de sensibilidad y resistencia.

De los 20 antibióticos estudiados para ambas especies y los 5 supernumerarios estudiados únicamente para *L. innocua*, se observa una alta sensibilidad al 90% de los antibióticos (AMC; AMP; CIP; CLR; C; CN; IPM; LEV; LZD; MEM; MXF; P; RD; SXT; TEC; TE; TGC; VA) para las 26 cepas *L. monocytogenes*; mientras que en el caso de las 25 cepas estudiadas de *L. innocua* se comprueba una sensibilidad frente al 84% de los 25 antibióticos estudiados para esta especie. Coincidiendo los antibióticos a los que fue muy sensible la especie patógena, con excepción de la penicilina G y la tetraciclina, frente a los cuales *L. innocua* se muestra intermedia o resistente.

Tablas 24: Concentración de antibiótico del disco y valores críticos de los diámetros (mm) de la zona de inhibición.

	Antibiótico	Denominación	CA-SFM	
			Sensible	Resistente
<i>L. monocytogenes</i> y <i>L. innocua</i>	Amoxicilina/clavulánico	AMC; 30 µg	≥ 23	< 16
	Ampicilina	AMP; 10 µg	≥ 21	< 16
	Ciprofloxacino	CIP; 5 µg	≥ 25	< 22
	Claritromicina ^a	CLR; 15 µg	≥ 22	< 17
	Clindamicina	DA; 2 µg	≥ 15	< 15
	Cloranfenicol	C; 30 µg	≥ 23	< 19
	Gentamicina	CN; 10 µg	≥ 18	< 16
	Imipenem	IPM; 10 µg	≥ 24	< 17
	Levofloxacino	LEV; 5 µg	≥ 20	< 17
	Linezolid	LZD; 30 µg	≥ 28	< 24
	Meropenem ^b	MEM; 10 µg	≥ 26	< 26
	Moxifloxacino	MXF; 5 µg	≥ 24	< 21
	Oxacilina	OX; 1 µg	≥ 20	< 20
	Penicilina G	P; 10 µg	≥ 29	< 18
	Rifampicina	RD; 30 µg	≥ 19	< 14
	Sulfametoxazol/Trimetoprim ^b	SXT; 25 µg	≥ 29	< 29
	Teicoplanina	TEC; 30 µg	≥ 17	-
	Tetraciclina	TE; 30 µg	≥ 19	< 17
Tigeciclina	TGC; 15 µg	≥ 22	< 22	
Vancomicina	VA; 30 µg	≥ 17	-	
<i>L. innocua</i>	Eritromicina ^b	E; 15 µg	≥ 25	< 25
	Estreptomicina	S; 10 µg	≥ 15	< 13
	Minociclina	MH; 30 µg	≥ 19	< 17
	Sulfametoxazol	RL; 25 µg	≥ 17	< 12
	Trimetoprim	W; 5 µg	≥ 16	< 12

^bEUCAST, 2011.

Puesto que la lectura del halo de inhibición de algunos antibióticos en algunas cepas de *L. innocua* suscitó dudas debido a su proximidad al punto de corte que determina su susceptibilidad, se realizó un estudio de la CMI para concretar el resultado.

4.5.3.2. Método de Epsilon-test (E-test)

La lectura de la CMI se efectúa en la intersección de la elipse de inhibición con la tira de antibiótico, expresándose el resultado en µg/ml. Si el crecimiento toca la sección negra de la tira, se interpreta como el valor en la siguiente sección blanca por encima de donde el crecimiento ha finalizado, aunque si se requiere, puede determinarse como el punto intermedio entre los valores indicados en las secciones blancas (Figura 16).

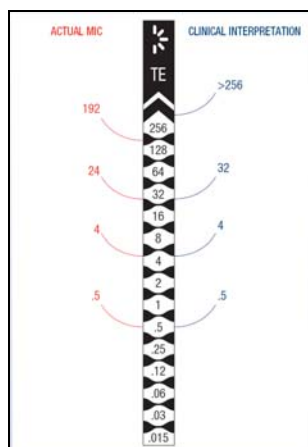


Figura 16: Lectura de la CMI en la placa de agar del Epsilon-test (E-test).

Se ha estudiado la susceptibilidad de 3 cepas de *L. innocua* frente al ciprofloxacino, dando como resultado susceptibilidad intermedia mediante el método disco-placa; a 6 cepas de esta misma especie en las que se obtuvo sensibilidad intermedia frente a la penicilina G; y a 12 cepas que presentaron resistencia frente a la tetraciclina en el test disco-placa, pero próximas a susceptibilidad intermedia. En la Tabla 25 se muestra el número total de cepas ensayadas de *L. innocua* y su CMI para cada uno de los antibióticos.

Tabla 25.- CMI obtenidas en las cepas de *L. innocua* estudiadas mediante el E-test.

Antibiótico	CMI (µg/ml)																	
	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Ciprofloxacino (3)									3									
Penicilina G (6)									4	2								
Tetraciclina (12)														12				

() Número de cepas estudiadas.

Las concentraciones críticas para el ciprofloxacino están establecidas en menor o igual de 0,5 µg/ml para la sensibilidad y mayor de 1 µg/ml para la resistencia. Esto significa que 3 de las cepas de *L. innocua* con halos próximos al punto de corte de sensibilidad intermedia en el antibiograma disco-placa (25 mm), sí son sensibles.

De las 6 cepas de *L. innocua* en las que se ha estudiado su susceptibilidad frente a la penicilina G, en las 6 se ha confirmado su sensibilidad intermedia a dicho antibiótico, ya que según las recomendaciones del CA-SFM, una cepa es sensible si la concentración crítica es menor o igual a 0,25 µg/ml y resistente cuando supera los 2 µg/ml.

Tras la interpretación de los resultados obtenidos de las 12 cepas estudiadas mediante el E-test frente a tetraciclina, podemos confirmar la resistencia de la cepa de *L. innocua* a dicho antibiótico, ya que su CMI es de 16 µg/ml, considerándose resistente cuando ésta es mayor de 8 µg/ml.

4.5.3.3. Sensibilidad o resistencia de las cepas de *L. monocytogenes* y *L. innocua*

En la Tabla 26 se muestra el porcentaje de cepas de ambas especies de *Listeria* según su susceptibilidad antimicrobiana frente a los antibióticos estudiados mediante el método disco-placa y E-test.

Tabla 26.- Porcentajes finales de susceptibilidad a los antimicrobianos ensayados en 51 cepas de *Listeria* spp. aisladas a partir de productos cocidos.

Antibióticos	Abreviatura; concentración	<i>L. monocytogenes</i> (26 cepas)			<i>L. innocua</i> (25 cepas)		
		S*	I	R	S	I	R
β- Lactámicos							
Amoxicilina-ác. clavulánico	AMC; 30 µg	100			100		
Ampicilina	AMP; 10 µg	100			100		
Oxacilina	OX; 1 µg			100			100
Penicilina G	P; 10 µg	100			76,0		24,0
Aminoglucósidos							
Gentamicina	CN; 10 µg	100			100		
Estreptomycin	S; 10 µg	100			100		
Glucopéptidos							
Vancomicina	VA; 30 µg	100			100		
Teicoplanina	TEC; 30 µg	100			100		
Macrólidos							
Claritromicina	CLR; 15 µg	100			100		
Eritromicina	E; 15 µg	100			100		
Tetraciclinas							
Tetraciclina	TE; 30 µg	100			48,0		52,0
Minociclina	MH; 30 µg	100			100		
Fluoroquinolonas							
Ciprofloxacino	CIP; 5 µg	100			100		
Levofloxacino	LEV; 5 µg	100			100		
Moxifloxacino	MXF; 5 µg	100			100		
Carbapenemas							
Imipenem	IPM; 10 µg	100			100		
Meropenem	MEM; 10 µg	100			100		
Fenicoles							
Cloranfenicol	C; 30 µg	100			100		
Oxazolidinonas							
Linezolid	LZD; 30 µg	100			100		
Sulfamidas							
Sulfametoxazol-trimetoprim	SXT; 25 µg	100			100		
Sulfametoxazol	RL; 25 µg	100			100		
Trimetoprim	W; 5 µg	100			100		
Lincosamidas							
Clindamicina	DA; 2 µg	80,8		19,2	20,0		80,0
Gliciliclinas							
Tigeciclina	TGC; 15 µg	100			100		
Rifampicinas							
Rifampicina	RD; 30 µg	100			100		

S= Sensible; I= Intermedio; R= Resistente.

Antibióticos supernumerarios para *L. innocua*.

De los 25 antibióticos utilizados para realizar este ensayo de susceptibilidad antimicrobiana frente a *Listeria spp.* se ha comprobado la resistencia de esta bacteria a varios de ellos, dependiendo de la especie. De forma que, *L. monocytogenes* mostró un 19,2 % de resistencia frente a clindamicina y un 100% respecto oxacilina, mientras que *L. innocua* lo fue frente a clindamicina con un 80%, oxacilina con un 100% y tetraciclina con un 52%. El 100% de resistencia a la oxacilina por parte de las dos especies es un dato esperado dada la conocida resistencia natural por parte de *Listeria spp.* a este antimicrobiano (CA-SFM,2010), coincidiendo con los estudios de (Harakeh y col., 2009) y (Pesavento y col., 2009). Según información de la CA-SFM, también se puede esperar una elevada resistencia frente a las lincosamidas (clindamicina). Igualmente cabe destacar la susceptibilidad intermedia que muestra *L. innocua* (24%), frente a penicilina G.

El tratamiento de elección de la listeriosis es ampicilina o amoxicilina combinada con aminoglucósidos (generalmente gentamicina), siendo la asociación trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol) el tratamiento de segunda elección o alternativo para pacientes alérgicos a esos antibióticos (Mediavilla y col., 1998; Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), 2004; Centro Nacional de Referencia de *Listeria*, 2009).

Todas las cepas estudiadas han sido altamente sensibles a los antibióticos de elección utilizados en el tratamiento de la listeriosis, resultados que están de acuerdo con los aportados por Aureli y col. (2003), Balsalobre y Hernández-Godoy (2004), Zamora y col. (2006) y Pesavento y col. (2010).

5. CONCLUSIONES

Primera

Tres muestras de productos cárnicos cocidos LPC de las cincuenta y una analizadas han presentado recuento de *L. monocytogenes*/g, ninguna el día de la compra y siendo mayores tanto en número como en ufc/g en la mitad y el final del periodo de duración mínima almacenadas a 10°C.

Segunda

Sólo en el día de la compra se detecta *L. monocytogenes* en el 10% de las muestras de jamón/paleta de cerdo, este porcentaje se mantendrá durante el periodo de duración mínima a 4°C y se duplicará a la temperatura de 10°C. La especie *L. innocua* sigue una tendencia parecida.

Tercera

En otros productos se comprueba la bacteria patógena en porcentajes del 29% a 4°C y 10°C en mitad del periodo de duración mínima, reduciéndose un 50% al final del periodo a ambas temperaturas. En las muestras de pavo loncheado la presentación de *L. monocytogenes* en 25 g fue irregular, no superando el 9%.

Cuarta

Durante el almacenamiento a 4°C la presencia de la especie patógena aumenta hasta la mitad del periodo de duración mínima y se mantiene constante hasta el final, esta misma tendencia se observa en *L. innocua* a la temperatura señalada. En el almacenamiento de los productos a 10 °C se produce un ligero aumento de ambas especies hasta la mitad del periodo de duración mínima aumentando la presencia de *L. monocytogenes* hasta el final, mientras que *L. innocua* permanece constante.

Quinta

Las 26 cepas que inicialmente se confirmaron por su morfología en el agar ALOA, como *L. monocytogenes* y las 25 cepas como *Listeria* spp., se sancionaron en agar Rapid`L. mono, las primeras como tal y las segundas como *L. innocua*. Las pruebas de preidentificación y el sistema comercial de identificación revalidó los resultados obtenidos. Por lo tanto, el agar ALOA identifica perfectamente las colonias de *L. monocytogenes* y para el resto de especies más habituales de *Listeria* se pueden reconocer con el agar Rapid`L. mono; igualmente es válido para *L. monocytogenes*.

Sexta

Las medidas de a_w de todos los tipos de productos cárnicos cocidos LPC, se encuentran entre 0,974 y 0,999, intervalo de actividad de agua muy adecuado para el crecimiento de *L. monocytogenes*. El Reglamento 2073/2005 considera alimentos LPC que no pueden favorecer

el desarrollo de *L. monocytogenes*, aquellos que presentan una $a_w \leq 0,92$ o aquellos con $pH \leq 5$ y $a_w \leq 0,94$.

Séptima

Los valores de pH, a las 6 horas de incubación del medio EB, a lo largo del periodo de duración mínima, reflejan muy pocas diferencias entre grupos de alimentos, al igual que en el transcurso del tiempo de almacenamiento a 4°C y 10°C, estimándose entre 6,5 y 7,0; estando todos ellos dentro del intervalo de pH favorable para el desarrollo de *Listeria*. El reglamento 2073/2005 señala que no pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes* los alimentos LPC con $pH \leq 4,4$ o $pH \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$.

Octava

Se produce mayor número de aislamientos de *L. monocytogenes* en caldo Fraser, que en los otros dos medios utilizados, dándole a éste mayor validez en la detección de la especie patógena. Entre el caldo One-*Listeria* y el caldo EB es mayor el número de análisis en los que se identifica *L. monocytogenes* con el primer medio de enriquecimiento, en ambos casos se presentan diferencias. Estos mismos resultados se obtienen para *L. innocua* y para *Listeria* spp.

Novena

Cuando relacionamos el ennegrecimiento del medio Fraser a media concentración con el medio Fraser a concentración normal con detección de *Listeria* spp., se comprueba que el ennegrecimiento del medio no es determinante para dar un resultado de positividad o negatividad a la detección del *Listeria* spp. Algo similar, aunque en menor proporción, ocurre cuando utilizamos el medio ONE-*Listeria*.

Décima

L. monocytogenes ha presentado un 19,2% (5 cepas) resistentes a la clindamicina, mientras que *L. innocua* ha presentado al mismo antibiótico un 80% (20 cepas) y un 52% (13 cepas) resistentes a la tetraciclina. Se comprueba también, una sensibilidad disminuida a la penicilina G (6 cepas intermedias). Como era de esperar el 100% de las especies de *Listeria* fueron resistentes a la oxacilina. Todas las cepas ensayadas presentan buena sensibilidad a los antibióticos de elección de la listeriosis así como a los que se usan como alternativa o segunda elección.

6. REFERENCIAS

- Abuín, C. M. F., Fernández, E. J. Q., Sampayo, C. F., Otero, J. L. R., Rodríguez, L. D., y Sáez, A. C. 1994. Susceptibilities of *Listeria* species isolated from food to nine antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 1655-1657.
- AFSSA. 2005. AVIS 9/3/2005 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur la révision de l'avis 2000-SA-0094 sur la classification des aliments au regard du risque représenté par *Listeria monocytogenes* et les protocoles de tests de croissance (Saisine nº2003-SA-0362).
- Annunziata, V., Rizzi, V., Acciari, V., Iannetti, L., Giovannini, A., Serraino, A., Calderone, D., Rossi, D., Morelli, D., Marino, L., Migliorati, G., y Caporale, V. 2012. *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. *Food Control*, 25, 150-158.
- Anónimo. 1995. Métodos de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/143ssa15.html>.
- Anónimo. 2005. REGLAMENTO (CE) nº 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea. L 338/1.
- Anónimo. 2007. REGLAMENTO (CE) Nº 1441/2007 DE LA COMISIÓN de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 de la Comisión relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L322, 12-29.
- Anónimo. 2010. DECISIÓN DE LA COMISIÓN de 5 de noviembre de 2010 relativa a una ayuda financiera de la Unión para un programa de seguimiento coordinado de la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en determinados alimentos listos para el consumo que ha de llevarse a cabo en los Estados miembros. 2076/678/UE. Diario Oficial de la Unión Europea, L 292, 40-54.
- Aureli, P., Ferrini, A. M., Mannoni, V., Hodzic, S., Wedell-Weergaard, C., y Oliva, B. 2003. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 325-330.
- Balsalobre, B., y Hernández-Godoy, J. 2004. Resistencias a antibióticos en *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* entérica aislados de alimentos de origen animal. *Revista de Salud Ambiental*, 4, 42-46.
- Balsalobre, B., y Hernández-Godoy, J. 2004. Resistencias a antibióticos en *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* entérica aislados de alimentos de origen animal. *Revista de Salud Ambiental*, 4, 42-46.
- Centro Nacional de Referencia de *Listeria*. 2009. Rapport annuel d'activite du Centre National de Reference des *Listeria* annee 2008. Institut Pasteur/Institut de Veille Sanitaire. Disponible en: <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-ccoms-des-listeria/actualites-rapports/index>.
- CLSI. 2006. Protocols for Evaluating Dehydrated Mueller-Hinton Agar; Approved Standard-Second Edition. Document CLSI M6-A2, Volume 26 Number 6. Replaces M6-A, Volume 16 Number 9.

- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). 2010. Recomendations 2010. Disponible en: http://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=Recommandations+2010&source=web&cd=2&ved=0CDEQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.sfm-microbiologie.org%2FUserFiles%2Ffile%2FCASFM%2Fcasfm_2010.pdf&ei=pR8IT7X9POOn0QWFpbzOCg&usg=AFQjCNFYkdS1Z2vR8jqX_AP4kdJpf9hwmQ&cad=rja.
- Cornelius, A. J., Hudson, J. A., y Wong, T. L. 2008. Enumeration and growth of naturally occurring *Listeria* spp. in unpackaged ham. *Food Microbiology*, 25, 407-412.
- David, W., Fleming, M. D., Stephen, L., Cochi, M.D., Kristine, L., MacDonald, M. D., Jack Brondum, D. V.M., M. S., Peggy, S., Hayes, B. S., Brian, D., Plikaytis, M. S., Marion, B., Holmes, B. S., Audurier, Ph.D., Claire, V., Broome, M. D., Arthur, L., y Reingold, M. D. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *The New England Journal of Medicine*, 312, 404-407.
- Drevets, D. A., y Bronze, M. S. 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 53, 151-165.
- EFSA. 2007. Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods and the related risk for human illness. EFSA (Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)). *The EFSA Journal*, 599, 1-42.
- EFSA. 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10, 2597.
- Elson, R., Burgess, F., Little, C. L., y Mitchell R. T. 2004. Microbiological examination of ready-to-eat cold sliced meats and pâté from catering and retail premises in the UK. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 499-509.
- EUCAST. 2011. *Listeria monocytogenes*. Calibration of zone diameter breakpoints to MIC values. Disponible en: http://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=listeria%20monocytogenes.%20calibration%20of%20zone%20diameter%20breakpoints%20to%20mic%20values&source=web&cd=1&ved=0CEwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.eucast.org%2Ffileadmin%2Fsrc%2Fmedia%2FPDFs%2FEUCAST_files%2FDisk_criteria%2FL_monocytogenes_1.0_December_2011.pdf&ei=8IXtT_HuKPS00QWxupCJDg&usg=AFQjCNGzxnB4vRK55FLjGYVMcPrXexcgWW&cad=rja.
- FAO/OIE/OMS. 2008. Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN). Nota informativa N° 2/2008 – Resistencia a los antimicrobianos: “Resistencia a los antimicrobianos transferida por animales *productores de alimentos*”.
- FAO/OMS. 2004. Serie de evaluación de riesgos microbiológicos 4. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Geornaras, I., y von Holy, A. 2001. Antimicrobial susceptibilities of isolates of *Staphylococcus aureus*, *Listeria* species and *Salmonella* serotypes associated with poultry processing. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 29-35.
- Gómez, E. 1993. “Listeriosis humana: importancia, grupos de riesgo y portadores”. *Listeria* en alimentos. Ministerio de Sanidad y Consumo.

- Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Milillo, S. R., den Bakker, H. C., Wiedmann, M., Swaminathan, b., y Sauders, B. D. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1280–1288.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M. F., Bielecka, M. K., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O., y Lecuit, M. 2010. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 136-138.
- Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E., y Alwan, N. 2009. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. *Science of the Total Environment*, 407, 4022-4027.
- Hudson, J. A., Lowry, B. D., Boerema, J. A., y DeLacy, K. M., 1991. Prevalence of *Listeria* spp. in retail meat products. *Communicable Disease in New Zealand*, 92, 56–57.
- Hudson, J. A., Mott, S. J., Delacy, K. M., y Edridge, A. L., 1992. Incidence and coincidence of *Listeria* spp., motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat fleshfoods. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 99-108.
- ICMSF. 2002. “*Listeria monocytogenes* en salchichas cocidas (Frankfurters)”. *Microorganismos de los alimentos 7. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria*. ICMSF. Acribia, S.A., Zaragoza, España.
- Jay, J. M. 1992. *Microbiología Moderna de los alimentos*. 3ª .Ed. Acribia: 457-475.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., y Golden, D. A. 2005. “Listeriosis de origen alimentario”. *Microbiología Moderna de los alimentos*. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, España.
- Junttila, J. R., Niemelä, S. I., y Hirn, J. 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non haemolytic *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 321-327.
- Larson, A. E., Johnson, E. A., y Nelson, J. H.. 1999. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *Journal of Dairy Science*, 82, 1860–1868.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., y Allerberger, F. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 2210–2214.
- Liu, D. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 645-659.
- Marcos, B. 2007. Mejora en la seguridad alimentaria de productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes. Tesis doctoral IRTA. Universidad de Girona.
- Mediavilla, A., Flórez, J., y García-Lobo, J. M. 1998. “Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociaciones de antibióticos”. Flórez, J., Armijo, J. A., y Mediavilla, A. *Farmacología Humana*. 3ª Edición. Masson Multimedia, Barcelona, España.
- Miller, A. J. 1992. Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, 55, 414-418.

- Murray, E. G. D., Webb, R. A. y Swann, M. B. R. 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29, 407–439.
- Obregón, G., y Zavaleta, A. 2000. Control de calidad de discos de sensibilidad antibiótica comercializados en el mercado peruano (1998-1999). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 17, 14-20.
- OMS. 2005. “La contención de la resistencia a los antimicrobianos”. *Perspectivas políticas de la OMS sobre medicamentos*. Ginebra.
- Ooi, S.T. y Lorber, B. 2005. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases* 40, 1327-1333.
- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). 2004. Elección de antibiótico según el agente etiológico. Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/amr-guia-tratamiento.htm>.
- Oxoid, 2010. *Listeria* Precis. Folio No 1252/MS/11/10. Disponible en: http://www.oxoid.com/pdf/uk/27363_Listeria_Precis.pdf.
- Palacián, M. P., Cameo, M. I., Arazo, P., Marco, M. L., y Revillo, M. J. 2011. Infecciones por *Listeria monocytogenes*. *Revista Española de Quimioterapia*, 24, 112-114.
- Pérez-Rodríguez, F., Castro, R., Posada-Izquierdo, G. D., Valero, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R. M., y Zurera, G. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. *Meat Science*, 86, 479-485.
- Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N., y Lo Nostro, A. 2010. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*, 21, 708-713.
- Rodrigues, M. J. R. M., Capell, C. J., y Kirby, R. M. 1995. A new capacitance medium for presumptive detection of *Listeria* spp. from cheese samples. *Journal of Microbiological Methods*, 23, 291-296.
- Ross, T., Rasmussen, S., Fazil, A., Paoli, G., y Sumner, J. 2009. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats in Australia. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 128-137.
- Seeliger, H., y Jones, D. 1986. “Genus *Listeria*”. *Bergey’s Manual of systematic Bacteriology*. Vol II. Williams & Wilkins. Baltimore. EE.UU.
- SEIMC. 1999. Oteo, J., Alós, J. I. *Listeria* y listeriosis. Informe del Control de Calidad SEIMC. Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. Madrid.
- Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A., y Mercado, M. 2005. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *MVZ-Córdoba*, 10, 511-543.
- Trepat, M. 2002. Incidencia y comportamiento de *Salmonella* y *Listeria* en pechugas de pavo curadas. Tesis Doctoral: 12-52, Universidad Autónoma de Barcelona.
- UNE-EN-ISO 11290-1: 1997/A1. 2005. Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. Modificación 1: Modificación del medio de aislamiento y de la prueba de la hemólisis e inclusión de los datos de precisión. Asociación Española de Normalización y Certificación.
- UNE-EN-ISO 11290-2: 2000/A1. 2005. Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria*

monocytogenes. Parte 2: Método de recuento. Modificación 1: Modificación del medio recuento. Asociación Española de Normalización y Certificación.

- Uyttendaele, M., Busschaert, P., Valero, A., Geeraerd, A. H., Vermeulen, A., Jacxsens, L., Goh, K. K., De Loy, A., Van Impe, J. F., y Devlieghere, F. 2009. Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 94-104.
- Uyttendaele, M., De Troy, P., y Debevere, J. 1999. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 75-80.
- Vlaemynck, G., Lafarge, V., y Scotter, S. 2000. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 430-441.
- Wong, T. L., Carey-Smith, G. V., Hollis, L., y Hudson, J. A. 2005. Microbiological survey of prepackaged pâté and ham in New Zealand. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 106-107.
- Yücel, N., Çitak, S., y Önder, M. 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. *Food Microbiology*, 22, 241-245.
- Zamora, J. M., Chaves, C., y Arias, M. L. 2006. Comparación del perfil de sensibilidad a antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. aisladas a partir de alimentos con cepas de origen clínico. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)*, 56, 171-174.

