



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Evaluación de riesgo de *Listeria monocytogenes* en alimentos diana

Alumna: Carmen Serrano Rísquez

Julio, 2020



Universidad de Jaén
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin De Grado

Evaluación de riesgo de *Listeria monocytogenes* en alimentos diana

Alumna: Carmen Serrano Rísquez

Julio, 2020

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL	6
2. OBJETIVOS	10
3. MÉTODOLOGÍA	10
4. EVALUACIÓN DE RIESGOS	12
4.1 IDENTIFICACIÓN DEL PELIGRO	12
4.2 CARACTERIZACIÓN DEL PELIGRO	13
4.2.1 LISTERIOSIS	13
4.2.2 EVALUACIÓN DOSIS-RESPUESTA	15
4.3 DETERMINACIÓN DE LA EXPOSICIÓN	17
4.3.1 TAMAÑO DE LA POBLACIÓN Y CARACTERÍSTICAS	18
4.3.2 FRECUENCIA DE CONSUMO	19
4.3.3 PRESENCIA Y CONCENTRACIÓN EN ALIMENTOS	20
4.3.3.1 FACTORES QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO DE LISTERIA	23
4.3.3.2 PRESENCIA EN ALIMENTOS	32
4.4 CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO	34
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA	38

ABREVIATURAS

- AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.
- AFSSA: Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Alimentos.
- EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
- ETA: Enfermedad de Transmisión Alimentaria.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations): Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- INE: Instituto Nacional de Estadística.
- Potencial de crecimiento (δ): Es la diferencia entre el número de $\log_{10}$ UFC/g al final y al principio del experimento (Ziegler, Rüegg, Stephan, & Guldemann, 2018).
- RENAVE: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
- RTE (Ready To Eat): Se refiere a productos listos para el consumo.
- UFC: Unidades Formadoras de Colonias.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo de revisión bibliográfica es la realización de una evaluación de riesgos para determinar el riesgo asociado al consumo de alimentos de IV gama contaminados con *Listeria monocytogenes* en España. Para llevarla a cabo se ha seguido el procedimiento definido por el *Codex Alimentarius* de, identificación del peligro, caracterización del peligro, determinación de la exposición y caracterización del riesgo. Además, para el apartado de determinación de la exposición se han consultado diferentes organismos tales como la INE, la EFSA, la FAO o el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente, con el fin de recopilar datos actualizados sobre la población española, frecuencia de consumo, presencia en los alimentos y los principales factores que afectan a su crecimiento, permitiendo al final clasificar a estos productos cualitativamente según la probabilidad de desarrollar la listeriosis tras su consumo.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, Alimentos de IV gama, Evaluación de riesgos, Listeriosis.

ABSTRACT

The aim of this literature review is to conduct a risk assessment to determine the risk associated with the consumption of *Listeria monocytogenes* contaminated fresh-cut products in Spain. The procedure defined by the *Codex Alimentarius* for hazard identification, hazard characterization, exposure assessment and risk characterization has been followed. In addition, for the exposure determination section, different bodies such as the INE, the EFSA, the FAO or the Ministry of Agriculture, Food and Environment have been consulted in order to compile updated data on the Spanish population, frequency of consumption, presence in food and the main factors that affect its growth, allowing at the end to classify these products qualitatively according to the probability of developing listeriosis after consumption.

Key words: *Listeria monocytogenes*, Fresh-cut products, Risk assessment, Listeriosis.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por las alteraciones en la inocuidad de los alimentos, también conocidas como enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs), siguen siendo uno de los mayores problemas de la salud pública, y del comercio, a nivel mundial. No obstante, a lo largo de los años se ha ido produciendo un progreso en su prevención y reducción gracias a la mejora de los sistemas de seguridad alimentaria. En países desarrollados, más de un tercio de la población se ve afectada por enfermedades de transmisión alimentaria cada año y, es probable que este problema esté más extendido en países en desarrollo (FAO & WHO, 2006), debido a la falta de controles exhaustivos en los productos. De ahí, la creciente necesidad por parte de los gobiernos, industrias alimentarias y consumidores de tener unos criterios estrictos que garanticen la calidad de estos alimentos.

Las ETAs pueden ser provocadas por agentes químicos, físicos y/o biológicos, siendo estos últimos el tema de estudio de este trabajo. Son numerosos los agentes biológicos descritos (virus, bacterias, priones y parásitos) que pueden causar enfermedades de transmisión alimentaria debido a la contaminación de los alimentos durante los procesos de producción o almacenamiento, ya sea a causa del uso de agua contaminada, aplicación de tratamientos térmicos no eficaces o uso de máquinas contaminadas. Entre estos microorganismos patógenos se puede destacar a *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., Virus de la hepatitis A o Norovirus. Los síntomas clínicos más típicos, provocados por la ingesta de estos agentes, son los problemas gastrointestinales como diarrea, náuseas, vómitos y dolor estomacal, aunque en casos más graves pueden provocar afectaciones neurológicas, abortos o incluso la muerte. Por esta razón, es de gran importancia evaluar los peligros que puedan ser introducidos a través de los alimentos para, de esta forma, tomar medidas en el comercio alimentario que disminuyan los riesgos de enfermedad en la población.

Existe por tanto un interés, que queda reflejado en la normativa vigente en la Unión Europea y en la implementación de ésta a los Estados miembros, que recoge la exigencia de que los alimentos destinados a consumo humano estén libres de gérmenes patógenos. Esto explicaría las distintas iniciativas que tanto la Comisión Europea como la Organización Mundial del Comercio, bajo las recomendaciones del *Codex Alimentarius*, vienen desarrollando para iniciar vías de evaluación del peligro real de diferentes gérmenes patógenos.

En concreto, este trabajo se va a centrar en la evaluación del riesgo de la transmisión de *Listeria monocytogenes*, a través de alimentos de IV gama puesto que son de los menos investigados frente a otros productos listos para el consumo como carnes, lácteos y pescados, que han sido ampliamente estudiados.

1.1 ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL

La primera vez que se aisló *L. monocytogenes* de individuos infectados fue en 1929 y, desde entonces se notificaron diversos casos de listeriosis asociados a trabajadores que estaban en contacto con animales enfermos (Farber & Peterkin, 1991). No fue hasta 1980, debido a la aparición de varios brotes en Europa y Norte América, cuando se confirmaron los alimentos como principal vía de transmisión de *Listeria* a los humanos. De hecho, se creía que la posible causa de ese brote fueran las hortalizas frescas (FAO & WHO, 2004; Farber & Peterkin, 1991). Desde ese momento, *L. monocytogenes*, agente etiológico de la listeriosis, supone una gran preocupación en el ámbito de la industria alimentaria.

En 1963, la Organización Mundial de la Salud y la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura crearon la Comisión del *Codex Alimentarius* (CCA) cuyo fin era desarrollar un programa conjunto FAO/OMS que creara una serie de normas, directrices y códigos internacionales, recogidos en el *Codex Alimentarius*, que garantizaran la distribución de alimentos inocuos y de calidad a todas las partes del mundo. Fue a finales del siglo XX, cuando la CCA, con el fin de reforzar los sistemas de seguridad alimentaria y, con ello, garantizar la salud pública empezó a implementar en la industria alimentaria una herramienta llamada análisis de riesgos, que ya había sido aplicada internacionalmente en otros ámbitos de trabajo, tales como el medio ambiente o el tecnológico. Su aplicación en este terreno permite estimar la importancia que tiene para la salud pública la presencia de un determinado patógeno en uno o varios productos, definir un nivel de protección adecuado contra este y, establecer directrices que garanticen la seguridad de los alimentos asociados a la transmisión del peligro (Bover i Cid & Garriga i Turón, 2014).

Según el *Codex Alimentarius*, el proceso de análisis de riesgos está compuesto por 3 etapas (Figura 1):

- a) La **evaluación de riesgos** trata de aportar asesoramiento científico, a las autoridades alimentarias y productores de alimentos, sobre los efectos

adversos que pueden padecer los consumidores como consecuencia de su exposición a un peligro de origen alimentario.

- b) La **gestión de riesgos** es la etapa en la que las autoridades alimentarias y productores de alimentos toman decisiones, como la aplicación de controles apropiados y/o medidas reglamentarias, con el fin de reducir la contaminación por este peligro y/o la magnitud de las consecuencias.
- c) La **comunicación de riesgos** es la etapa en la que hay un intercambio de información y opiniones sobre el riesgo entre los evaluadores de riesgo, los encargados de la gestión y otros interesados.

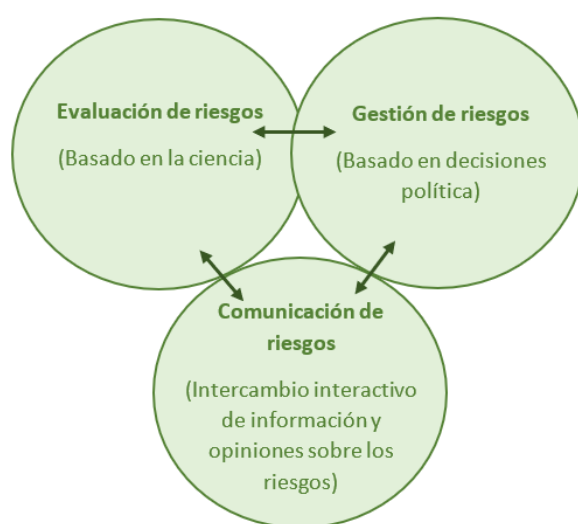


Figura 1: Componentes del análisis de riesgos. Adaptación de AESAN, s.f.

Las normas del *Codex* se basan en datos científicos proporcionados por evaluaciones de riesgo y, estas pueden cambiar conforme avance el conocimiento sobre los diferentes peligros presentes en los alimentos. El *Codex Alimentarius* y, por tanto, también las evaluaciones de riesgos son reconocidas por la Organización Mundial del Comercio (OMC) como medio para evaluar la inocuidad de los alimentos y resolver cuestiones comerciales. Además, mediante el acuerdo sobre la aplicación de medidas sanitarias y fitosanitarias (MSF), todos los miembros de la OMC se comprometen a realizar evaluaciones de riesgo con el fin de disminuir los riesgos en la salud. Esto ha hecho que las normas del *Codex* sean unas normas internacionales para facilitar el comercio internacional de alimentos y, también para ayudar a los gobiernos a establecer políticas nacionales (La OMS y el *Codex Alimentarius*, s.f.).

Actualmente, la lista de normas de seguridad alimentaria que tienen como fin garantizar la inocuidad de los alimentos es bastante extensa, sin embargo, siguen siendo numerosos los casos y brotes de listeriosis que aparecen tanto a nivel internacional como nacional. A nivel internacional, entre los años 2017-2018 en Sudáfrica y otros países africanos, se registró el brote más severo de listeriosis a nivel mundial ya que afectó a más de 1.000 personas y provocó la muerte de más de 200 (Desai, Anyoha, Madoff, & Lassmann, 2019). Tras diversas investigaciones usando el método de secuenciación genómica, el brote se asoció al consumo de carne lista para el consumo (RTE). A nivel europeo, en 2018 se confirmaron 2.549 casos, siendo España el segundo país con más casos después de Alemania (EFSA, 2019). En España, entre los años 2015 - 2018, se notificaron a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) 1.369 casos de listeriosis y 8 brotes, aunque estos afectaron a un número reducido de personas y, correspondían a la misma familia (ISCIII, 2019). Posteriormente, en 2019, se notificó el mayor brote de listeriosis a nivel nacional en Andalucía asociado al consumo de carne mechada, que afectó a más de 200 personas y, provocó 7 abortos y 3 muertes (Lepe, 2020).

Es por el alto número de casos y la severidad de la listeriosis, que *L. monocytogenes* supone una gran preocupación en el ámbito de la industria alimentaria ya que, debido a su importante ubicuidad y resistencia, contamina una elevada cantidad de alimentos, pero principalmente, productos que son listos para el consumo (RTE) como frutas, verduras, productos lácteos, cárnicos y de la pesca. Estos alimentos RTE favorecen el crecimiento de *Listeria* puesto que, al ser una bacteria resistente a las bajas temperaturas, puede crecer durante los periodos de tiempo que estén los alimentos almacenados en los frigoríficos y, además, a esto se le suma que normalmente se consumen sin un tratamiento térmico previo. Por esta razón, es muy importante que las industrias alimentarias conozcan los factores que favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes* en estos productos durante el proceso de producción, transporte y almacenamiento, para tomar medidas que impidan o reduzcan su crecimiento durante estas fases.

Antes, la mayoría de los casos se asociaban principalmente a alimentos como la leche y lácteos no pasteurizados, embutidos, patés, salchichas y pescados ahumados (Cartwright, *et al.*, 2013), por ello casi todos los artículos y evaluaciones que se publicaban se relacionaban con su consumo (Johnson, Doyle, & Cassens, 1990; Notermans, Dufrenne, Teunis, & Chackraborty, 1998). Esto es debido a que estos

alimentos presentan unas características fisicoquímicas más favorecedoras para el crecimiento de la bacteria comparadas con las que tienen otros como las verduras o las frutas. Sin embargo, desde que en los últimos años se han confirmado también como medios de transmisión los helados, las ensaladas, las frutas como el melón (McCollum, *et al.*, 2013) y hortalizas como las coles, el número de investigaciones en torno a estos alimentos ha ido aumentando (Desai, Anyoha, Madoff, & Lassmann, 2019).

Este trabajo se va a centrar en uno de los tres componentes del análisis de riesgo, la evaluación de riesgos. Como se ha mencionado antes, en esta etapa se hace una evaluación científica de los efectos adversos que pueden sufrir las personas que consumen estos alimentos, ante la exposición a un patógeno de transmisión alimentaria y, que servirá posteriormente para la toma de decisiones (Evaluación de riesgos, s.f.). La evaluación de riesgos a su vez consta de 4 fases: identificación del peligro, caracterización del peligro, determinación de la exposición y caracterización del riesgo.

Las importantes transformaciones que se han venido produciendo a nivel socioeconómico, han tenido su reflejo en el ámbito de consumo alimentario, generando nuevos hábitos alimenticios. Entre ellos, a partir de finales de la década de 1980, se produjo un incremento importante del consumo de productos preparados y listos para su consumo. Y, en los últimos años se ha visto cómo se ha ido incrementando la demanda de los alimentos de IV gama, al verse como saludables y necesarios para seguir una dieta equilibrada. Si bien, como ya se ha comentado, la mayoría de las evaluaciones de riesgo sobre *Listeria monocytogenes* se han hecho en alimentos RTE cárnicos y lácteos, a pesar de que también puede aparecer en alimentos de IV gama, la siguiente evaluación de riesgo se ha limitado a este último tipo de alimentos, ya que se trata de un mercado relativamente nuevo y de rápido crecimiento, que ha hecho que aumente el riesgo de aparición de listeriosis. Los alimentos de IV gama son frutas y hortalizas frescas procesadas y listas para el consumo que no pasan por un proceso eficaz de eliminación de patógenos y, que además se consumen sin un tratamiento térmico previo, es por ello que se han detectado varios brotes de listeriosis asociados a estos alimentos, por ejemplo, en 2011, hubo un brote de listeriosis en Estados Unidos asociado al melón (McCollum, *et al.*, 2013) y, entre 2015-2016 hubo un brote relacionado con el consumo de ensaladas (Self, *et al.*, 2019).

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es llevar a cabo una evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos de IV gama a partir de una revisión bibliográfica analizando algunos de los estudios científicos publicados hasta ahora. Para alcanzar dicho objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Identificar factores que aumentan la probabilidad de desarrollar listeriosis.
- Determinar la presencia de *Listeria* en los alimentos de IV gama.
- Determinar los diferentes factores que afectan al crecimiento de *L. monocytogenes* en estos alimentos de IV gama.
- Clasificar a los alimentos de IV gama según la probabilidad de que provoquen listeriosis.

3. METODOLOGÍA

El siguiente trabajo se ha llevado a cabo realizando una búsqueda bibliográfica, sobre la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos de IV gama, en las principales bases de datos tales como *Pubmed*, *Science direct* y *Scopus*. Junto a éstas, se han consultado páginas de diferentes organizaciones, internacionales y nacionales, relacionadas con la salud y la seguridad alimentaria como son la Organización Mundial de la Salud, EFSA, AESAN y FAO.

Respecto a la estrategia seguida, por una parte, con el fin de acotar la búsqueda de artículos en las diferentes bases de datos se introdujeron palabras claves tales como “Listeriosis”, “*Listeria monocytogenes*”, “*Fresh cut products*”, “*Factors that affect the growth of Listeria*”, “*Prevalence*”, “*Shelf life*” and “*Challenge tests*”. Por otra parte, en las páginas de los diversos Organismos y Organizaciones, se han consultado informes y estudios realizados por personas expertas en la materia. También se hizo una recogida de datos oficiales con el fin de conseguir información acerca de:

- La frecuencia de consumo de los alimentos de IV gama: para ello, se consultó el informe publicado por el ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente del año 2018.
- Población española: Se consultó la base de datos del Instituto Nacional de Estadística sobre la población de España en 2018 dividida en franjas de edades.

- Presencia de *L. monocytogenes* en alimentos de IV gama: se consultaron los informes publicados por la EFSA entre los años 2016-2018. Para la recogida de datos, se seleccionaron los alimentos que concernían a esta evaluación de riesgo, es decir, las ensaladas RTE, las frutas RTE y las hortalizas RTE.

Por último, para la realización del trabajo, puesto que se trata de la elaboración de una evaluación de riesgos, se ha seguido su procedimiento, es decir, se ha dividido el apartado de resultados y discusión en 4 partes: Identificación del peligro, caracterización del peligro, determinación de la exposición y caracterización del riesgo.

4. EVALUACIÓN DE RIESGOS

4.1 IDENTIFICACIÓN DEL PELIGRO

En este apartado se va a caracterizar a *Listeria*, agente etiológico de la listeriosis y, que posteriormente se relacionará con el consumo de alimentos de IV gama.

En la actualidad, se conocen 19 especies del género *Listeria* (Leclercq, *et al.*, 2019), de las cuáles sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* han sido identificadas como patógenas de seres humanos y de animales, aunque se han descrito pocos casos de listeriosis en los primeros causada por *L. ivanovii*. Dentro de *L. monocytogenes* se han diferenciado 13 serotipos, dependiendo de los antígenos celulares y flagelares, de los cuales los serotipos 4b, 1/2a y 1/2b son los principales causantes de la enfermedad (Lorber, 2007).

Las distintas especies de *Listeria* se caracterizan por ser bacilos Gram-positivos, anaerobio facultativas, no formadoras de esporas y varían en tamaño, pero están entorno a los 0,4-0,5 μm de diámetro y 1-2 μm de largo. Son catalasa positivos y presentan β -hemólisis cuando crecen en agar sangre (Farber & Peterkin, 1991). Gracias a la presencia de flagelos peritricos presentan una movilidad típica, llamada *tumbling motility*, entre los 20–25°C, pero no a los 35° (FAO & WHO, 2004). Se trata de una bacteria psicotrofa con un rango de crecimiento entre 0° - 45°C, teniendo una temperatura óptima de crecimiento en torno a los 30°-37°C. Tolerancia a los ambientes salinos y puede crecer en pH de 4,4-9,4. En la siguiente tabla 1, se resumen los principales factores que afectan al crecimiento de *Listeria*.

	Puede crecer			Puede sobrevivir, pero no crecer
	VALORES MÍNIMOS	VALORES ÓPTIMOS	VALORES MÁXIMOS	
Temperatura (°C)	0°C	30-37°C	45°C	-18°C
Actividad de agua (a_w)	0,9-0,93	0,99	>0,99	<0,9
pH	4,4	7	9,4	3,3 - 4,2
Concentración de sal (%)	<0,5	0,7	12 - 16	≥ 20

Tabla 1: Factores que afectan a la supervivencia de *Listeria*. Adaptación de Iñigo & Jiménez, 2012.

Sus características de resistencia a diversas condiciones, como ambientes anaerobios, la acidez, las bajas temperaturas o la alta salinidad, justifican que pueda sobrevivir más a condiciones adversas que otras bacterias no formadoras de esporas y, por tanto, que esté ampliamente distribuida por suelos, plantas, forraje, materia fecal, aguas residuales e, incluso en plantas de procesamiento de alimentos. Este es un hecho relevante puesto que pueden crear biopelículas en las superficies de trabajo lo que les confiere una mayor resistencia a las radiaciones ultravioleta, ácidos, desecación, salinidad y, por tanto, a ser eliminada (Hanning, Johnson, & Rickie, 2008). Esto ha motivado al estudio en profundidad, mediante modelos matemáticos, del efecto de diferentes tratamientos antilisterianos y de varios parámetros ambientales sobre la supervivencia de esta bacteria.

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL PELIGRO

En este apartado se abordará, por una parte, la enfermedad causada por el patógeno, que va a depender de las condiciones fisiológicas e inmunológicas de la persona y, de la naturaleza del patógeno. Y, por otra, se van a estimar los efectos adversos para la salud en función de la cantidad de *L. monocytogenes* ingerida, es decir, se va a realizar una evaluación dosis-respuesta.

4.2.1 LISTERIOSIS

La bacteria *Listeria monocytogenes* es un patógeno oportunista que causa la listeriosis, enfermedad con una baja tasa de incidencia, 1,06 casos/100.000 habitantes en 2018, pero con una alta mortalidad, que puede ir desde el 10% hasta 50% (Bover i Cid & Garriga i Turón, 2014). En España, según el informe epidemiológico de listeriosis emitido por el centro nacional de epidemiología, en 2018 se notificaron 432 casos de listeriosis a la RENAVE (ISCI, 2019).

Como se puede observar en la figura 2, la listeriosis afecta principalmente a los grupos de riesgo que son los neonatos, las mujeres embarazadas (representadas en la gráfica por el aumento de casos en mujeres entre las edades de 25-44 años), las personas mayores y personas con el sistema inmune debilitado, sobre todo con una disminución de los linfocitos T, ya sea por una terapia inmunosupresora o por enfermedades que lo debiliten como SIDA o cáncer. En el resto de la población es poco frecuente o pasa desapercibida ya que, los síntomas son más leves, por lo que la gráfica representa principalmente los casos de listeriosis más graves.

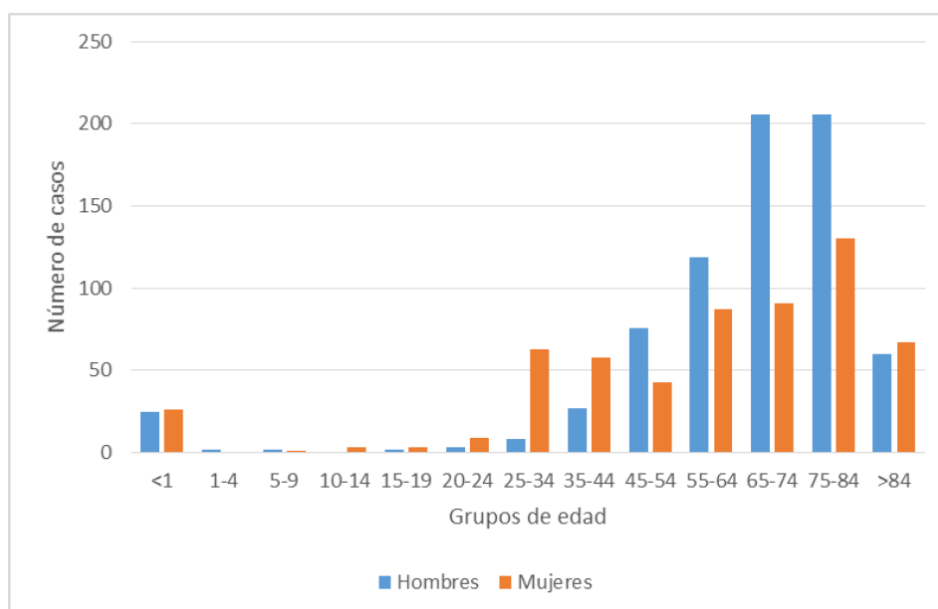


Figura 2: Número de casos de listeriosis en el periodo 2015-2018 por edad y sexo. (ISCI, 2019)

Las infecciones por *L. monocytogenes* ocurren principalmente tras la ingestión de alimentos contaminados y, provoca dos tipos de listeriosis: invasiva o no invasiva. Para que un individuo desarrolle la enfermedad o muestre síntomas, una parte de las bacterias ingeridas deben de sobrevivir a las condiciones adversas del estómago y llegar al intestino, donde atraviesan la barrera gastrointestinal, y producen infecciones sistémicas (Vázquez-Boland, *et al.*, 2001).

La listeriosis no invasiva es la manifestación más común que se da entre los individuos sanos tras la ingestión de altas dosis de la bacteria. En este caso los periodos de incubación son cortos, siendo de 11 horas - 7 días, y aparecen síntomas de gastroenteritis como, diarrea, fiebre y mialgias y, debido a que los síntomas son más leves, no se suelen reportar estos casos al sistema de salud (FAO & WHO, 2004). En cambio, la listeriosis invasiva se da principalmente en personas de riesgo y presenta una alta mortalidad (20-30%) en este grupo. Tiene periodos de incubación de 11-70 días con una media de 31 días (Lorber, 2007) y, suele mostrarse con síntomas clínicos más severos, como encefalitis, meningitis, abortos y septicemia en neonatos. Esto se debe, a que la bacteria se disemina por el torrente sanguíneo, llegando de esta forma al sistema nervioso o a la barrera placentaria (Vázquez-Boland, *et al.*, 2001).

En la figura 3 se ha representado el número de casos de listeriosis declarados a la RENAVE desde el 2015 hasta el 2018. Se ha escogido este periodo de tiempo

porque fue en 2015 cuando en España fue declarada una enfermedad de declaración obligatoria de carácter semanal, es decir, empezó a formar parte de una lista de enfermedades que son transmisibles y de gran importancia para la salud mundial¹. Antes de su implantación, los casos se declaraban voluntariamente al Sistema de Información Microbiológica (SIM), por lo tanto, los datos obtenidos de años anteriores son menos representativos.

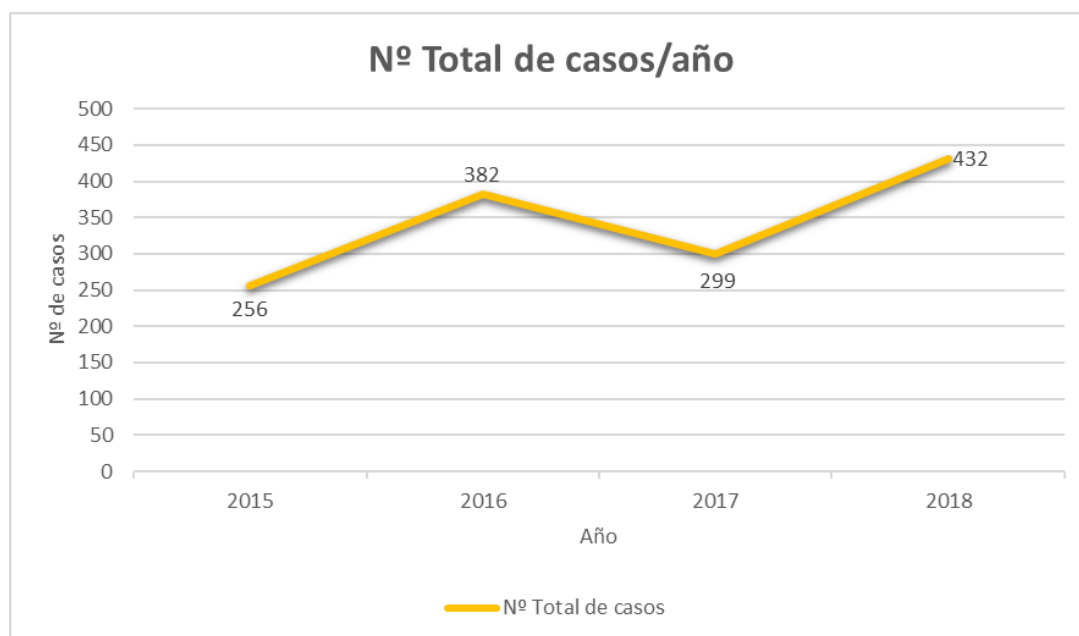


Figura 3: Número de casos de listeriosis declarados a la RENAVE en el periodo de 2015-2018. Elaboración propia.

Como se puede ver en la figura 3, el número de casos de listeriosis ha ido aumentando con los años. Este hecho puede estar relacionado con la implementación como enfermedad de declaración obligatoria o bien, se podría deber a un cambio en las rutinas de alimentación, es decir, que la gente se esté decantando más por alimentos listos para el consumo.

4.2.2 EVALUACIÓN DOSIS-RESPUESTA

La evaluación de dosis-respuesta trata de relacionar la dosis ingerida con la probabilidad y severidad de aparición de la enfermedad.

¹ «BOE» núm. 65, de 17 de marzo de 2015, páginas 24012-24015. Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional.

La dosis infectiva mínima de *Listeria monocytogenes* para que se produzca la enfermedad es un tema de discusión entre la comunidad científica, ya que esta depende de varios factores, entre los que cabe destacar, cepa y patogenicidad bacteriana y, susceptibilidad del huésped.

Por otra parte, es difícil calcular la dosis infectiva mínima ya que los periodos de incubación, en casos graves, son largos por lo que es difícil encontrar restos del alimento consumido y, en caso de que se encuentre el alimento, hay que tener en cuenta que ha habido un crecimiento bacteriano y que no todos los alimentos están contaminados por igual.

Según Vázquez-Boland, *et al.* (2001), hay casos esporádicos de listeriosis que se han relacionado con cantidades de 10^6 UFC/g, pero en personas con inmunodeficiencia esta cantidad puede ser inferior. De hecho, se han detectado casos de listeriosis asociados con dosis tan bajas como 10^2 - 10^4 UFC/g. En este sentido, la AFSSA (2008) propone que la dosis infectiva para que se produzca la enfermedad varía entre los 10^3 y los 10^7 UFC/g, algo que dependerá principalmente del sistema inmunitario de la persona y la virulencia de la cepa.

Otro aspecto a destacar, es que continuamente se consumen alimentos que contienen pequeñas concentraciones de *Listeria* y no se producen infecciones, esto se debe a que la mayoría de individuos sanos presentan linfocitos T contra la bacteria, generados principalmente a partir de contactos anteriores con algunas especies del género *Listeria* u otras bacterias Gram positivas que comparten antígenos (Vázquez-Boland, *et al.*, 2001; Farber & Peterkin, 1991).

En la actualidad, a partir de datos epidemiológicos y datos experimentales en ratones y otros animales de laboratorio, se han creado diferentes modelos exponenciales que intentan relacionar los diferentes factores, con la probabilidad de aparición de la enfermedad, pero aún no se sabe cuál es el modelo más cercano a la realidad (McLauchlin, Mitchell, Smerdon, & Jewell, 2004). Por ejemplo, en la evaluación de riesgo presentada por la FAO/WHO en 2004 se utilizó el siguiente modelo dosis-respuesta (Figura 4) para describir la probabilidad de desarrollar listeriosis invasiva dependiendo del tipo de población que consuma el alimento:

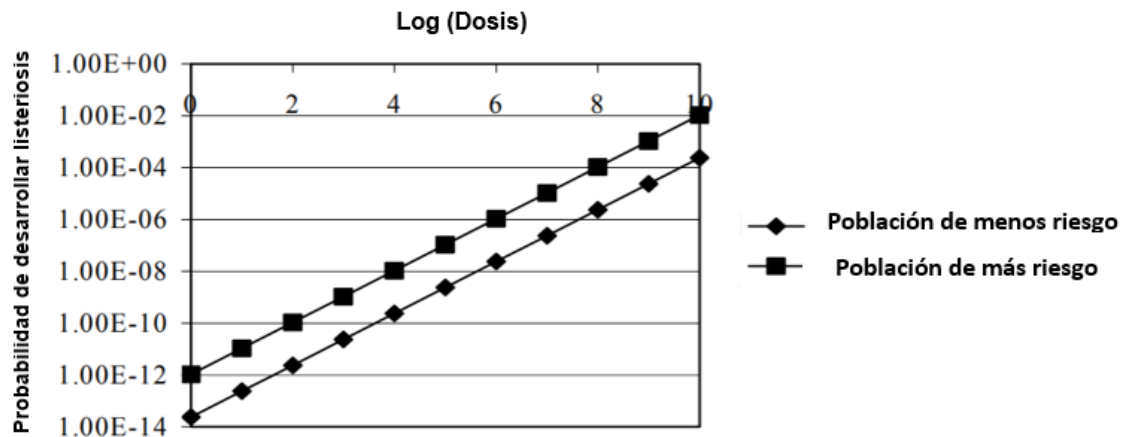


Figura 4: Modelo dosis-respuesta dependiendo del tipo de población que esté expuesta. Adaptación de Lake, Hudson, Cressey, & Gilbert, 2005.

La fórmula que describe el modelo es:

$$P \text{ (Probabilidad de enfermedad)} = 1 - \exp^{-R \cdot N}$$

R= variable que define la relación dosis/respuesta. Depende de la población, ya que refleja su susceptibilidad.

N= Número de bacterias consumidas.

Como se muestra en el modelo de dosis-respuesta y como muchos científicos afirman, la única dosis segura de *L. monocytogenes* es cero, incluso para personas saludables (Lake, Hudson, Cressey, & Gilbert, 2005). Aunque, la probabilidad de desarrollar listeriosis invasiva debido a la ingesta de bajas dosis, como se puede apreciar, es muy baja. Además, al hacer una distinción entre los tipos de población, se puede ver que las probabilidades de desarrollar listeriosis invasiva siempre son mayores en personas de riesgo que en personas sanas y, que a mayor dosis de *Listeria* mayor es la probabilidad de desarrollar la enfermedad.

4.3 DETERMINACIÓN DE LA EXPOSICIÓN

La listeriosis es una enfermedad de transmisión alimentaria en el 99% de los casos (Oliver, Wiedmann, & Boor, 2007). Sin embargo, también se puede transmitir de la madre al feto, a través de la placenta o a través del canal del parto, o de animales infectados a ganaderos y/o veterinarios, aunque esto ocurre en menor proporción.

En el apartado de determinación de la exposición se evalúa cuan probable es que una persona ingiera *L. monocytogenes* a través de los alimentos, así como el número de patógenos que se ingieren. Para realizar esta evaluación se necesitan datos sobre:

- La población expuesta al riesgo.

- La frecuencia de consumo de los alimentos de IV gama.
- Los datos de presencia y concentración de *Listeria monocytogenes* en las frutas y hortalizas frescas, tras el procesamiento y almacenamiento y, a la hora de consumirlas (Rocourt, BenEmbarek, Toyofuku, & Schlundt, 2003). De esta forma se puede ver el efecto que tienen los tratamientos aplicados durante y tras el procesamiento, y determinar cuál es la probabilidad de exposición.

Según Bover i Cid & Garriga i Turón (2014), algunos factores que pueden favorecer la aparición de casos y brotes de listeriosis tienen que ver con el hecho de que:

- El alimento es un producto perecedero que se debe de conservar en refrigeración.
- El alimento tiene una vida útil relativamente alta, superior a 5 días.
- Las características del producto permiten el crecimiento de *Listeria* en niveles elevados durante la vida útil de este.
- El alimento es un producto listo para el consumo.
- El producto puede ser consumido por la población de riesgo.

4.3.1 TAMAÑO DE LA POBLACIÓN Y CARACTERÍSTICAS

La determinación de la población expuesta es un factor muy importante ya que, como se ha explicado en el apartado de identificación del peligro, hay una parte de la población que es más propensa al desarrollo de listeriosis.

En esta parte del trabajo y para hacer esta determinación, basándonos en el estudio llevado a cabo por García-Béjar Bermejo (2014), se han recogido datos del Instituto Nacional de Estadística sobre la población del 2018 y, se ha distinguido entre población no susceptible y susceptible, en esta última se ha incluido a la población de más de 65 años, infantiles (menores de 4 años) y mujeres embarazadas (15 - 49 años). Y el resto, es la población no susceptible.

Como se muestra en la figura 5, al menos el 24% de la población es de riesgo ya que, el 5% son niños o niñas de entre 0-4 años y el 19% son personas con más de 65 años. A este porcentaje se le sumaría el número de mujeres embarazadas, que haciendo una aproximación con los nacimientos que se produjeron en 2018, esto es 372.777, viene a representar un 0,8% mediante aproximación en el rango 15 a 49 años. Además, también se debería de sumar el número de personas que están inmunodeprimidas que es desconocido.

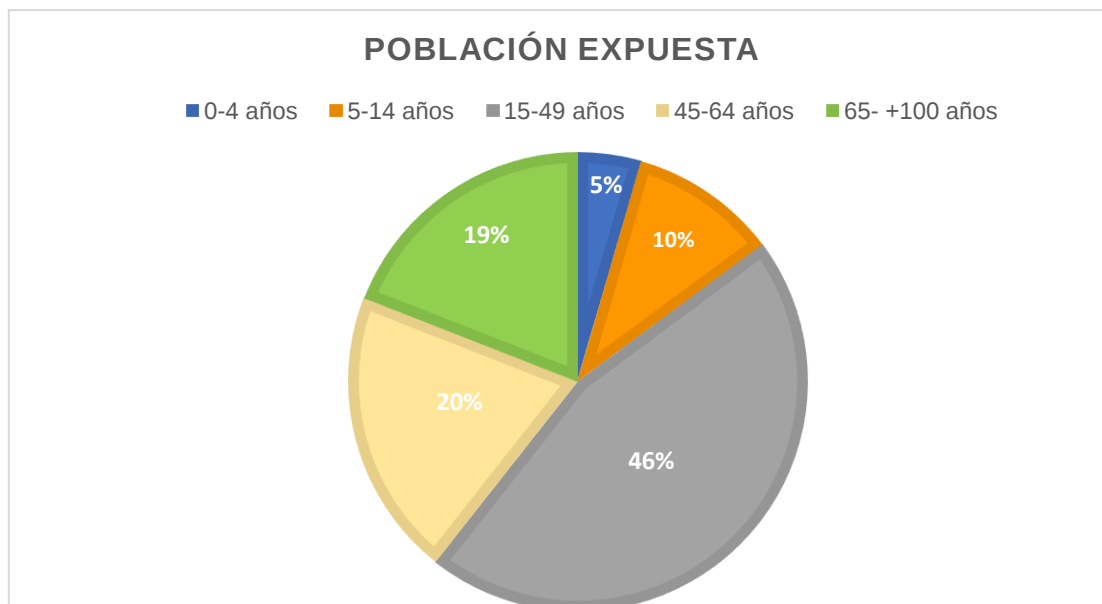


Figura 5: Gráfica con de la población española dividida en franjas de edades. Datos obtenidos del Instituto nacional de Estadística. Elaboración propia.

4.3.2 FRECUENCIA DE CONSUMO

Para determinar la frecuencia de consumo de frutas y hortalizas de IV gama en la población española en 2018, se han cogido los datos publicados en el informe del consumo alimentario elaborado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

La figura 6 muestra como si bien entre diciembre de 2016 y diciembre de 2017 el consumo (volumen) de alimentos de IV gama se mantiene más o menos constante, se produce un importante incremento en enero de 2018, ya que casi se duplica, con una tendencia al alza en los meses siguientes para empezar a disminuir de nuevo a partir de los meses de octubre y noviembre de 2019.

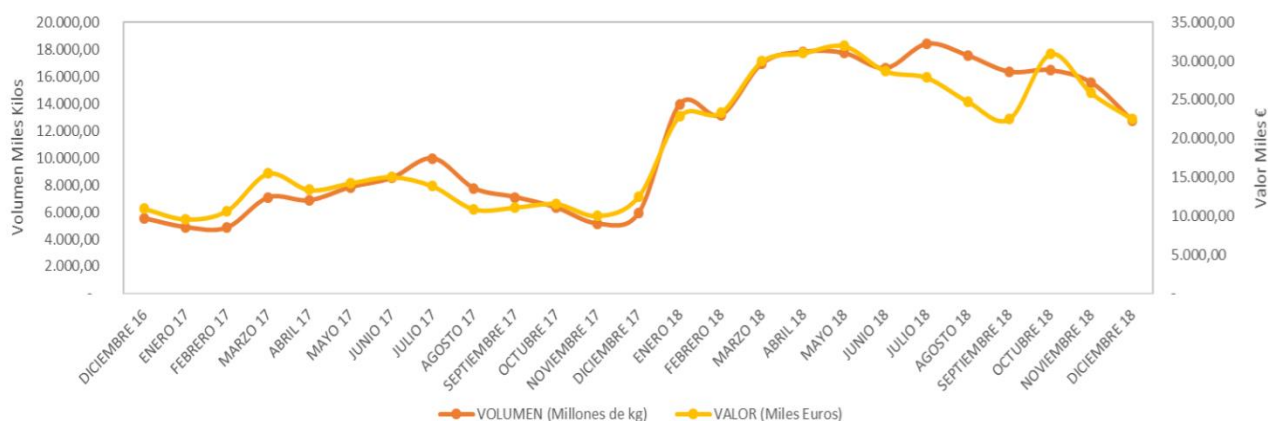


Figura 6: Evolución del consumo de hortalizas y frutas de IV gama entre 2016-2018. Obtenida de: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2018.

Con respecto al consumo de estos alimentos (Figura 7), los porcentajes más altos se observan en la población de más de 65 años, siendo la población de menos de 35 años las que presentan los valores más bajos. Por otra parte, los grupos de edad comprendidos entre los 25-49 y los 50-64, reflejan que su consumo está más o menos acorde con su tamaño en la población. Esto se traduce en que además de que son las personas mayores de 65 años las más susceptibles en contraer la listeriosis, son a su vez las más expuestas dado su alto consumo de alimentos de IV gama.

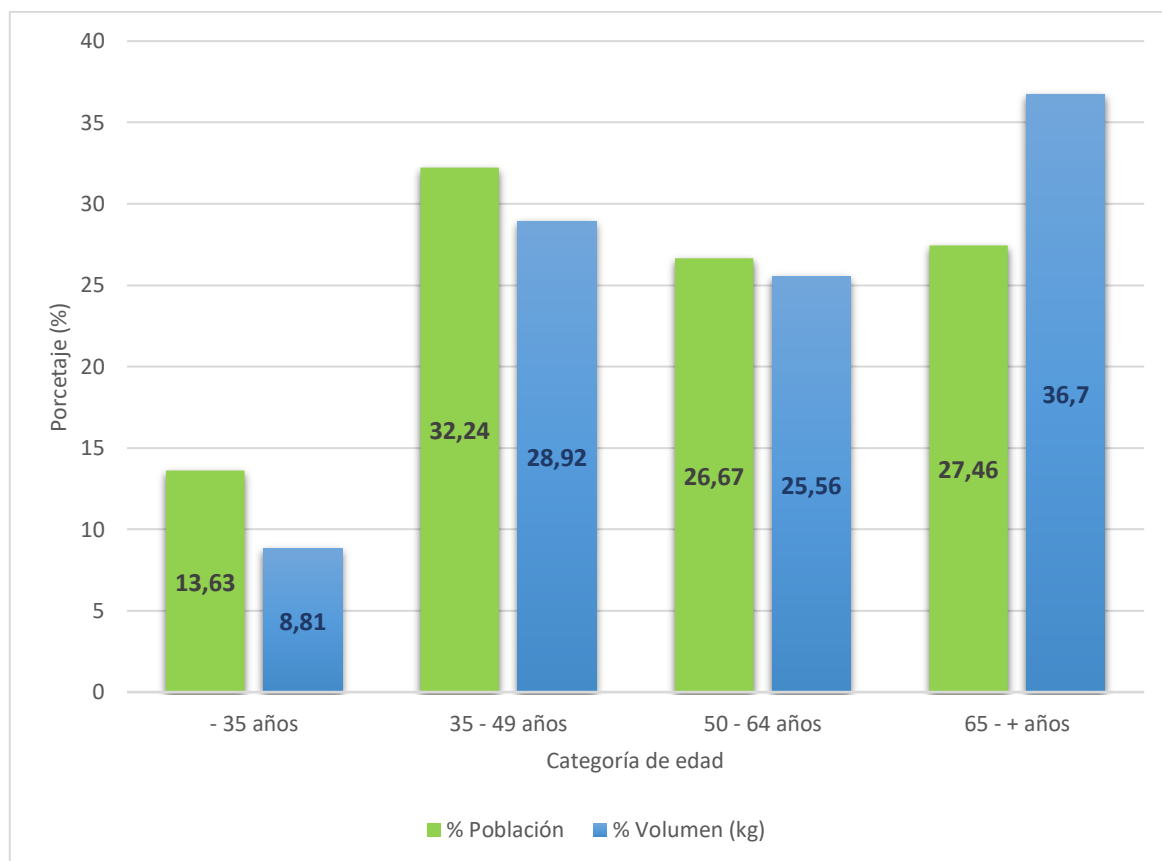


Figura 7: Frecuencia de consumo de hortalizas y frutas procesadas por población española. Elaboración propia.

4.3.3 PRESENCIA Y CONCENTRACIÓN EN ALIMENTOS

Durante el proceso de producción de alimentos listos para el consumo y, en concreto, de alimentos de IV gama, hay determinadas etapas que están asociadas con el riesgo de contaminación y/o crecimiento de *L. monocytogenes*, señaladas en la figura 8. Uno de los pasos más importantes es el de la aplicación de tratamientos que reduzcan los niveles de *Listeria* presentes en el producto, aunque esta acción no asegure una total inocuidad (Gil Muñoz, Allende, Beltrán Riquelme, & Selma, 2005). Esto se debe a que en caso de que queden pequeñas concentraciones de *Listeria* en

los productos y las propiedades intrínsecas y extrínsecas de éstos lo permitan, en los periodos de almacenamiento y transporte aumentará su concentración. Es por ello necesario que los productores tengan información sobre las condiciones que permiten el crecimiento de las bacterias en los alimentos para que lo tengan en cuenta y, de esta forma, se tomen medidas que aseguren la inocuidad de los alimentos.

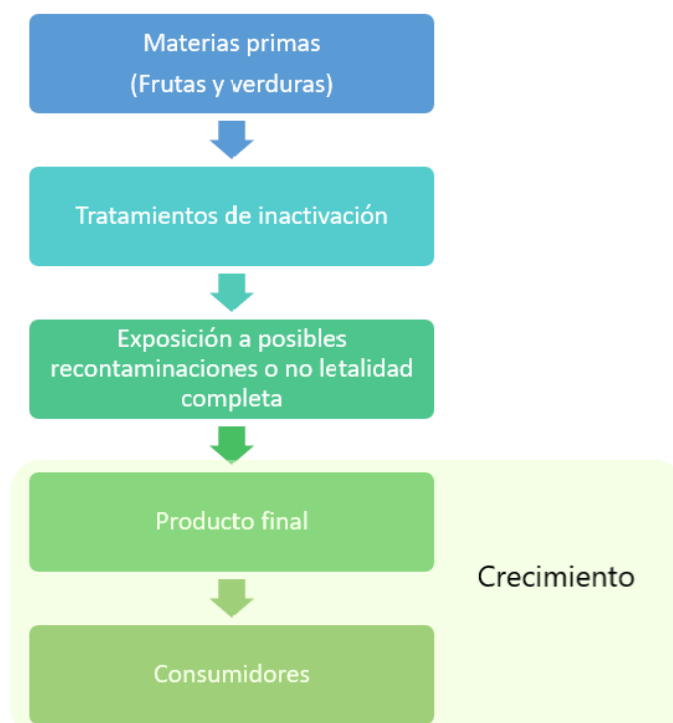


Figura 8: Etapas en el proceso de producción de alimentos de IV gama con impacto en la concentración de *L. monocytogenes* en el producto. Elaboración propia

Algunos métodos para inactivar el crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos de IV gama son:

- Temperatura: *L. monocytogenes* no es termorresistente, por lo que aplicando un tratamiento térmico durante el tiempo adecuado reducirá considerablemente el número de microorganismos (Tabla 2) (Carrasco Jiménez, 2007).

Temperatura (°C)	Tiempo
60	45 min
65	10 min
70	2 min
75	30 s
80	5 s
85	1 s

Tabla 2: Combinaciones de temperatura-tiempo para conseguir una reducción de 10^6 UFC (Carrasco Jiménez, 2007).

- pH: La rapidez de inactivación depende del acidulante, siendo más eficaces los ácidos orgánicos como ácido acético o láctico. Además, si se combina el pH y un tratamiento con temperatura, la inactivación será más rápida (Lake, Hudson, Cressey, & Gilbert, 2005).
- Radiación: *L. monocytogenes* es especialmente sensible a los rayos UV. Si se aplica una dosis de 1-3 Gy, dependiendo del tipo de hortaliza o fruta, se consigue una reducción considerable de hongos, levaduras y bacterias (Lake, Hudson, Cressey, & Gilbert, 2005).
- Atmósfera rica en CO₂: *Listeria* puede crecer en concentraciones relativamente altas de CO₂ (≈30%) aunque, si se combina con temperaturas bajas, se retarda el crecimiento de la bacteria. Para conseguir una inhibición total de su crecimiento se requiere de un 100% de CO₂ (Bover i Cid & Garriga i Turón, 2014).

Como los métodos de letalidad anteriores no garantizan la total inactividad de la bacteria, entre las medidas de gestión para minimizar el riesgo de listeriosis en los consumidores está la aplicación de unos criterios de seguridad microbiológicos, basados en evaluaciones de riesgo, que establecen unos límites legales con respecto a la prevalencia de *L. monocytogenes* en el producto. Estos criterios, recogidos en el Reglamento (CE) no 2073/2005, se establecen en función de la susceptibilidad de la población a la que esté destinado el producto y la posibilidad de que el alimento favorezca o no el crecimiento de *Listeria*:

- 1- Si el alimento está destinado a poblaciones de riesgo, tales como lactantes y para usos médicos, se aplica el criterio de “tolerancia cero” en el que se exige la ausencia de bacteria en 25 g de producto y en un total de 10 muestras.
- 2- Si el producto no está destinado a la población de riesgo, el nivel de *L. monocytogenes* no puede superar las 100 UFC/g durante la vida útil del producto y, para ello, se analizan 5 muestras por lote del producto. Y, en caso de que no se pueda demostrar este requisito, se aplica el criterio de ausencia de *Listeria* en 25 g de producto tras el análisis de 5 muestras, antes de que el alimento haya dejado el control de la empresa alimentaria que lo ha producido.

Al ser productos mínimamente procesados, la única forma de cumplir con estos requisitos es: conociendo las características fisicoquímicas del producto (*aw*,

concentración de sal y pH) para saber cómo se va a comportar el patógeno, aplicando durante el procesamiento de manera eficaz los tratamientos antimicrobianos y, señalando la temperatura de almacenamiento y la vida útil del producto (Lianou & N. Sofos, 2007).

La vida útil de un alimento es el periodo de tiempo en el que, en condiciones definidas de conservación, el producto mantiene las propiedades sensoriales, fisicoquímicas y un perfil microbiológico adecuado (Manzo, *et al.*, 2015). En el caso de los alimentos de IV gama, el tiempo de vida útil es muy bajo (7-10 días) aunque se conserven en el frigorífico y, además, va a depender de sus características organolépticas y de la actividad metabólica de los microorganismos que contaminen el alimento (Manzo, *et al.*, 2015).

4.3.3.1 FACTORES QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO DE LISTERIA

Generalmente, cuando una bacteria se encuentra en un medio o, en este caso, en un alimento con condiciones favorables para su desarrollo, se produce el crecimiento bacteriano. Este se manifiesta con un aumento en la concentración o recuento de bacterias, expresado en $\log_{10}$ UFC/g. Si, en caso contrario, no se produce una multiplicación de bacteriana debido a que no se adapta al medio, los factores que inhiben su crecimiento se les conoce como bacteriostáticos, o en este caso, listeriosstáticos. Y si, por otra parte, se produce la inactivación de la bacteria, es decir, hay una disminución de la población significa que hay factores listericidas en el medio (Bover i Cid & Garriga i Turón, 2014).

La determinación de la capacidad de los alimentos para favorecer el crecimiento de *Listeria* en condiciones de almacenamiento previsibles es importante para que las empresas alimentarias puedan demostrar el cumplimiento de los criterios establecidos por el Reglamento Europeo, además de para poder asignar una vida útil adecuada al producto. La capacidad de crecimiento de *Listeria* en diferentes alimentos se puede estimar mediante la consulta de literatura científica en bases de datos, como *Microhibro* o *ComBase*, en las cuales se exponen modelos matemáticos predictivos sobre el crecimiento de la bacteria en diferentes productos, a partir de datos experimentales que describen su comportamiento en diferentes matrices (Baranyi & Tamplin, 2004). Sin embargo, en casos en los que los modelos predictivos no sean concluyentes, se requiere de la realización de pruebas de inoculación, *challenge tests* o pruebas de desafío (Álvarez-Ordóñez, Leong, Hickey, Beaufort, & Jordan, 2015).

Según el AESAN, estos tests consisten en la inoculación de una concentración definida de una mezcla de cepas de la bacteria en el producto a testar y, tras la exposición del producto a condiciones de temperatura favorables y desfavorables simulando las que se pueden tener durante el almacenamiento o el transporte, se mide el crecimiento de la bacteria en las diferentes condiciones y en diferentes intervalos. Mediante estos estudios se puede evaluar si un alimento permite o no el crecimiento de la bacteria, es decir, su potencial de crecimiento (δ) en un alimento y, la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) (AESAN, 2011).

El estudio del potencial de crecimiento se calcula como la diferencia entre el número de $\log_{10}$ UFC/g al final y al principio del experimento y permite clasificar a los alimentos como capaces de permitir el desarrollo de *Listeria*, en el caso de que el potencial de crecimiento sea mayor de $0,5 \log_{10}$ UFC/g, o no capaces de permitir el crecimiento si su potencial es menor o igual a $0,5 \log_{10}$ UFC/g, por lo que lo que se puede usar como indicador de peligro (AESAN, 2011).

A continuación, se van a analizar una serie de artículos en los que se han realizado pruebas de inoculación de *L. monocytogenes* en diferentes alimentos de IV gama, verduras y frutas, para ver cómo afectan al crecimiento bacteriano distintos factores intrínsecos, como la microbiota, pH o compuestos listericidas, y extrínsecos, como la temperatura o la composición de gases del envasado.

ESTUDIOS DE INOCULACIÓN EN FRUTAS

Con el fin de ver cómo afectan el pH y las temperaturas de almacenamiento a la capacidad de crecimiento de *L. monocytogenes* en diferentes productos frutícolas, mostrados en la tabla 3, se ha cogido como referencia el estudio de inoculación llevado a cabo por Ziegler, Rüegg, Stephan, y Guldemann (2018). En este estudio se hizo una combinación con las temperaturas de almacenamiento para intentar representar en primer lugar las condiciones de temperatura en fábricas (4°C) y, en segundo lugar condiciones abusivas de almacenamiento que simulan las temperaturas de los frigoríficos en las casas (8°C y 12°C).

Producto RTE	Ingredientes	pH
Mezcla de frutas 1	Dados de Piña (50,1%), Mango (17,6%), Pomelo (17,6%), Kiwi (11,8%) y Granada (2,9%)	3,4
Mezcla de frutas 2	Dados de Piña (36,6%), Melón (26,7%), Manzana (26,6%) y Uvas (10%)	4,2
Mezcla de frutas 3	Dados de Kiwi (20%), Melón (50%) y Piña (30%)	3,9
Mango	Dados de mango 100%	3,6
Melón	Melón 100%	5,6
Coco	Dados de coco 100%	6,4

Tabla 3: Productos RTE que se usaron en el estudio. Adaptación de Ziegler, Rüegg, Stephan, & Guldumann, 2018.

Basándose en los resultados obtenidos sobre las concentraciones de la bacteria y los potenciales de crecimiento (Figura 9 y tabla 4) se puede destacar que:

- El pH tiene un impacto significativo en el crecimiento de *L. monocytogenes* ya que, productos con un pH menor a 4,2, como el mango y las mezclas de frutas 1 y 3, inhiben prácticamente el crecimiento de *Listeria*, es decir, tienen un efecto listeriostático. Sin embargo, los productos con un pH igual o superior a 4,2, como el melón, el coco y la mezcla de frutas 2, favorecen el crecimiento de la bacteria. Además, también se puede ver que conforme más cerca del pH óptimo estén, pH 7, mayor es el potencial de crecimiento de la bacteria.
- La temperatura, en este caso, no tiene un impacto significativo en el crecimiento de la bacteria, ya que las concentraciones que se obtuvieron en ambas condiciones eran similares. Pero, cuando se compara el número viable (UFC/g) en los productos que sí permiten el crecimiento, se puede ver que hay un ligero crecimiento que es mayor en productos almacenados a 12°C. Sin embargo, en otro estudio, Feng, *et al.*, (2015), en el que se usan otras frutas y el mango, la temperatura se muestra como un factor importante para el crecimiento de *L. monocytogenes*. Puede ser que, en el estudio llevado a cabo por Ziegler, Rüegg, Stephan, & Guldumann (2018), no se vea un impacto significativo dado que se usan temperaturas abusivas muy similares. En cambio, en el otro estudio se ponen temperaturas de 5°C, 13°C y 25°C.

- El tiempo de almacenamiento también se muestra como un factor con un impacto significativo en el crecimiento de la bacteria en el caso de los alimentos que permiten el crecimiento de esta, por lo que se debería de tener en cuenta a la hora de poner un tiempo de vida útil al producto.
- Y, finalmente, los productos como mezcla de frutas 2, melón y coco se deberían de clasificar como alimentos que favorecen el crecimiento de *Listeria* ya que, el potencial de crecimiento supera los 0,5 UFC/g en algún punto de su vida útil en ambas condiciones de almacenamiento.

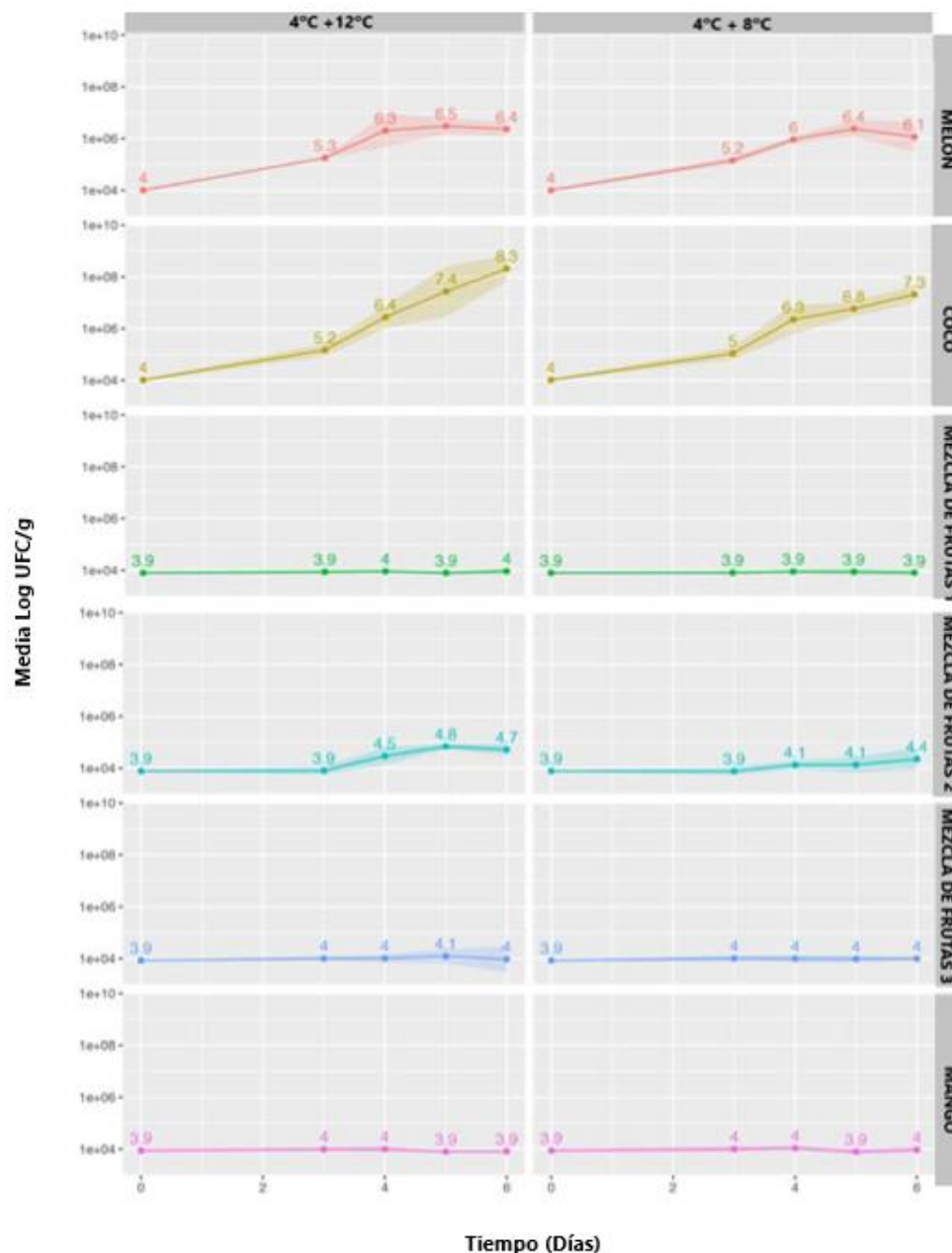


Figura 9: Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en los diferentes productos RTE. Adaptación de Ziegler, Rüegg, Stephan, & Guldemann, 2018. La concentración inicial es de 10^4 UFC/g.

Producto RTE	pH	Potencial de crecimiento (δ)	
		Condiciones 4°C + 12°C	Condiciones 4°C+8°C
Mezcla de frutas 1	3,4	0,1	0
Mezcla de frutas 2	4,2	0,8	0,5
Mezcla de frutas 3	3,9	0,1	0,1
Mango	3,6	0	0,1
Melón	5,6	2,4	2,1
Coco	6,4	4,3	3,3

Tabla 4: Potencial de crecimiento de *L. monocytogenes* en los diferentes productos RTE. Elaboración propia.

ESTUDIO DE INOCULACIÓN EN VERDURAS

Para este apartado se ha cogido como referencia el artículo llevado a cabo por Ziegler, Kent, Stephan, & Guldemann (2019) en el que también se calcula el potencial de crecimiento de la bacteria, pero en este caso se mide en 11 tipos de verduras listas para el consumo, señaladas en la tabla 5. En este estudio se pusieron temperaturas de almacenamiento de 5°C y 8°C, la primera para mostrar lo que sucedería cuando se conservan los productos a las temperaturas recomendadas y, en el segundo caso cuando se conservan a temperaturas abusivas.

PRODUCTO RTE
Lechuga
Ensalada de canónigos
Zanahoria rallada
Zanahoria a la Juliana
Ensalada mixta 1
Ensalada mixta 2
Perejil
Rábano
Remolacha
Rúcula
Apio
Repollo

Tabla 5: Productos RTE utilizados para el estudio de Ziegler, Kent, Stephan, & Guldemann, 2019.

Tras la obtención de los resultados, se puede ver una clara distinción entre productos que permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* (Figura 10) y, aquellos que además

de no permitir su crecimiento, disminuyen la concentración (Figura 11). Algunos aspectos a destacar son que:

- La temperatura y el tiempo sí tienen un impacto significativo en el crecimiento de *L. monocytogenes* ya que, los productos que se conservan a 5°C tienen un crecimiento de *Listeria* menor y más lento comparado con el crecimiento observado en productos conservados a 8°C.
- A 8°C todos los productos han superado los 0,5 UFC/g al cuarto día de almacenamiento, mientras que si se conservan a 4°C sólo la lechuga los supera (Tabla 6). Esto quiere decir que el potencial de crecimiento de la bacteria es mayor conforme aumenta la temperatura de almacenamiento.
- El perejil se puede clasificar como un producto que favorece mucho el crecimiento de *L. monocytogenes* ya que, a 5° y 8°C tras el cuarto día de almacenamiento siguen aumentando las concentraciones.

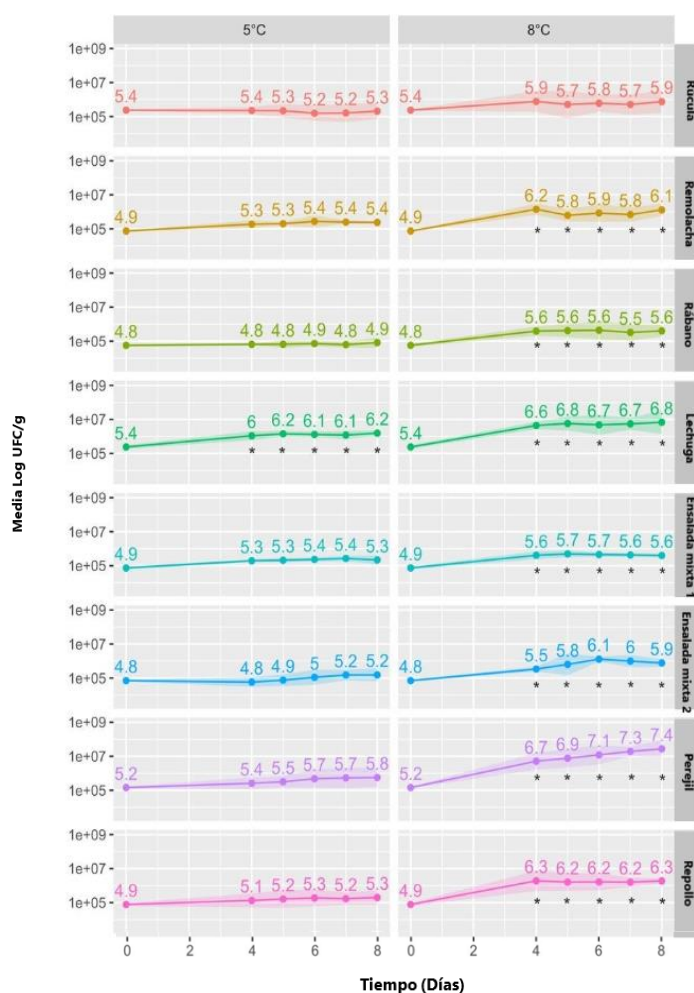


Figura 10: *L. monocytogenes* en productos que permiten su crecimiento. Adaptación de Ziegler, Kent, Stephan, & Guldman, 2019. Inoculación inicial de 10⁵ UFC/g. (El * señala cuando hay un crecimiento estadísticamente significativo).

Productos RTE	Almacenamiento a 5°C		Almacenamiento a 8°C	
	1-4 días	1-8 días	1-4 días	1-8 días
Rúcula	0	0	0,5	0,5
Remolacha	0,5	0,5	1,3	1,2
Rábano	0	0,1	0,7	0,7
Lechuga	0,6	0,8	1,2	1,4
Ensalada mixta 1	0,4	0,4	0,7	0,7
Ensalada mixta 2	0	0,4	0,7	1,1
Perejil	0,2	0,6	1,5	2,2
Repollo	0,2	0,4	1,4	1,4

Tabla 6: Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre el crecimiento potencial de *L. monocytogenes* en los diferentes alimentos. Elaboración propia.

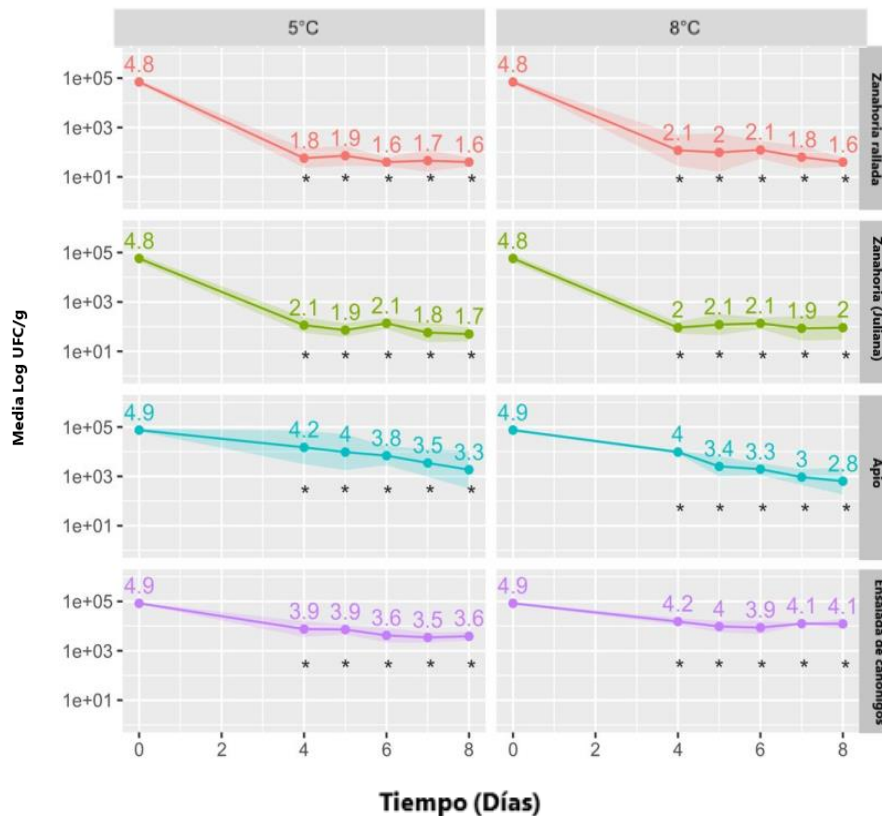


Figura 11: *L. monocytogenes* en productos RTE que no permiten su desarrollo. Adaptación Ziegler, Kent, Stephan, & Guldman, 2019. Inoculación inicial de 10⁵ UFC/g.

En esta última gráfica se puede ver que la zanahoria, el apio y la ensalada de canónigos no solo inhiben el crecimiento de *Listeria*, sino que además tienen un efecto listericida, siendo más notable en la zanahoria y en el apio. El efecto inhibidor de las zanahorias sobre *Listeria* ya había sido descrito en otros estudios y, aunque no se tienen evidencias de su actividad listericida, se cree que el compuesto puede ser la 6-metoximelina dado que se encuentra en el tejido de la zanahoria y por su gran espectro bactericida (Sant'Ana, Barbosa, Destro, Landgraf, & Franco, 2012; Noriega,

et al., 2010). Con respecto a la actividad listericida del apio, se debe a su alto contenido en nitrito, de hecho, el apio en polvo se usa en la curación de la carne debido a su alto poder antimicrobiano (Golden, McDonnell, Sheehan, Sindelar, & Glass, 2014; Ziegler, Kent, Stephan, & Guldemann, 2019). Sin embargo, no se ha descrito el porqué de este efecto en la ensalada de canónigos.

Por otro lado, Tucci, et al., (2019) hicieron un modelo predictivo de la velocidad de crecimiento de *L. monocytogenes* en la lechuga a diferentes temperaturas. Los resultados que obtuvieron, mostrados en la figura 12, permiten afirmar que la temperatura es un factor que ralentiza el crecimiento de *Listeria*, lo que permite alargar la vida útil de los productos. Por tanto, a parte de indicar la temperatura recomendada de almacenamiento también se debe de añadir la vida útil del producto, que dependiendo de las características del producto, suele ir de 7 a 14 días. El modelo predictivo muestra además, que la temperatura a la que hay un crecimiento más lento y menor es 4°C, mientras que a medida que se va aumentando la temperatura también lo hace la rapidez del crecimiento y las concentraciones de bacteria. Por ello, se puede deducir que los productos almacenados a temperaturas abusivas alcanzarán en menos tiempo la dosis infectiva necesaria para desarrollar listeriosis.

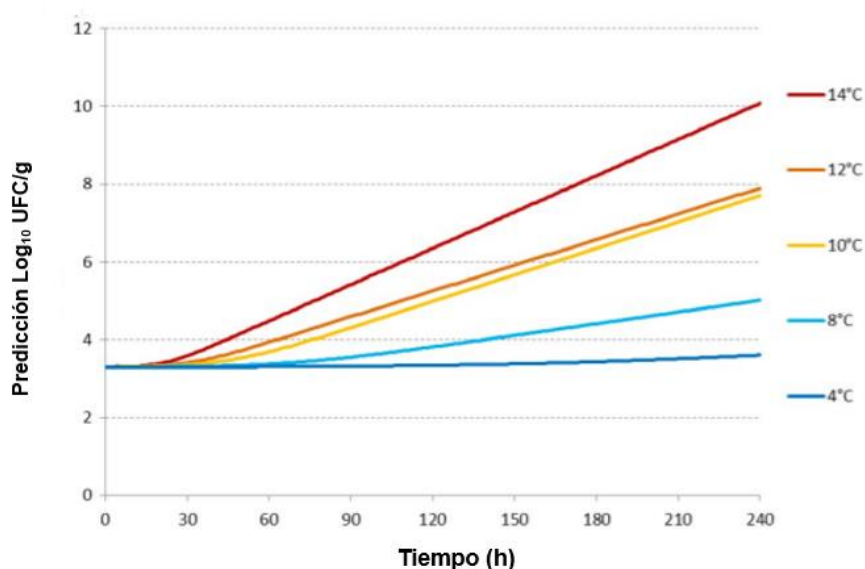


Figura 12: Predicción del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en lechuga iceberg a 4°C, 8°C, 10°C, 12°C y 14°C. Adaptado de Tucci, et al., 2019.

Más aún, también se ha visto que la temperatura afecta a la expresión de factores de virulencia en *L. monocytogenes*, tales como la hemolisina (*hlyA*), las internalinas (*inlA* y *inlB*), la actA o las fosfatidilcolina fosfolipasas (*plcA* y *plcB*). Según un estudio

llevado a cabo por Marras, *et al.*, (2019), la expresión de genes de virulencia en ensaladas de IV gama es directamente proporcional a la temperatura de almacenamiento, es decir, cuando se conservan a temperaturas bajas su expresión es menor (Figura 13).

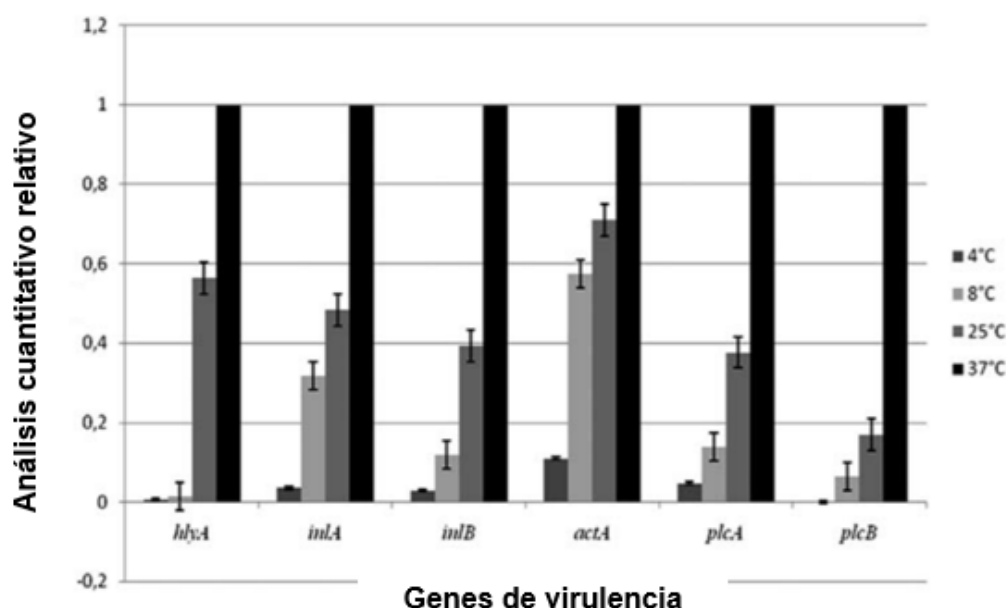


Figura 13: Expresión de genes de virulencia en función de la temperatura de almacenamiento. Adaptación de Marras, *et al.*, 2019.

Como se puede ver en esta última figura, a 4°C la expresión de los genes de virulencia es prácticamente inexistente, excepto en el caso del gen *actA* que sí aumenta, pero de forma mínima. A 8°C, también se puede observar que algunos factores de expresión como la hemolisina o la fosfatidilcolina fosfolipasa A tienen niveles de expresión bajos. Mientras que el resto, conforme se va aumentando la temperatura de conservación también aumenta la expresión de los factores de virulencia, llegando a tener una expresión total a 37°C.

Teniendo en cuenta estos datos, se puede afirmar que uno de los factores más importantes para inhibir y/o enlentecer el crecimiento de *L. monocytogenes* o disminuir su virulencia, es la conservación de los alimentos a la temperatura recomendada por el AESAN y otras instituciones, es decir, a una temperatura menor a 5°C. Sin embargo, en diferentes estudios se ha demostrado que la temperatura de los frigoríficos en las casas suele ser superior a 5°C, es decir, muestran temperaturas compatibles con el crecimiento de *Listeria* entre otros microorganismos. Por ejemplo, Carrasco, Pérez-Rodríguez, Valero, García-Gimeno, & Zurera, (2007) hicieron un estudio de la

temperatura media de los frigoríficos en Córdoba y esta se encontraba en los 6,68°C con una desviación de 2,94, e incluso se observó que había algunos en los que estos superaban los 10°C, aunque en un porcentaje menor. En otro estudio llevado a cabo en Cataluña por Jofré, Latorre-Moratalla, Garriga, & Bover-Cid, (2019) se observó que la temperatura media era de 5,4°C con una desviación de 2,3, pero el 41% de los frigoríficos tenían temperaturas superiores a 6°C. Por lo que se puede ver que, además de constituir un riesgo, se siguen manteniendo los hábitos desde el 2007 al 2019.

A parte de la temperatura y el pH, otros 2 factores que influyen en el crecimiento de *L. monocytogenes* son la microbiota presente en la superficie del producto y el envasado en atmósferas modificadas. La microbiota de las hortalizas actúa inhibiendo el crecimiento de *Listeria*, sin embargo, cuando se envasan los alimentos en atmósferas modificadas (MAP) se inhibe el crecimiento de las bacterias de la microbiota, pero no el de *Listeria* puesto que es una bacteria anaerobia facultativa. El envasado en MAP se realiza con el fin de inhibir el crecimiento de esta microbiota que es la causante del deterioro de los productos. No obstante, esto tiene un doble efecto negativo puesto que, por una parte, no hay un efecto inhibidor de esta MAP sobre *Listeria*, pudiéndose desarrollar libremente y, por otra, es que el aspecto del producto no indica que esté deteriorado por lo que, si no se cumple con la vida útil del producto, la probabilidad de desarrollar la enfermedad aumenta (Cai, Worobo, & Snyder, 2019; Carrasco Jiménez, 2007). Además, en los estudios de inoculación anteriores también se hicieron en productos que estaban envasados en MAP, por lo que se ha podido comprobar que este envasado no ha impedido el desarrollo de *Listeria*.

4.3.3.2 PRESENCIA EN ALIMENTOS

Los datos de presencia de *L. monocytogenes* en alimentos de IV gama han sido obtenidos a partir de los informes publicados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) entre los años 2016-2018. En la tabla 7, se observan los datos procedentes de muestras de productos hortícolas, frutícolas y ensaladas de IV gama tomadas en toda Europa y, en la tabla 8 se muestran los datos de presencia de *Listeria* en productos españoles. También se intentó hacer una búsqueda de datos de presencia a partir de estudios científicos llevados a cabo en España en estos productos. Sin embargo, actualmente son escasas las investigaciones que abordan este tema en alimentos de IV gama de origen español.

Producto	2016		2017		2018	
	N.º muestras	% positivos	N.º muestras	% positivos	N.º muestras	% positivos
Hortalizas y frutas listas para el consumo	1.772	0,5%	1.773	0,6%	1.257	1,8%
Ensaladas listas para el consumo	1.042	2%	902	4,2%	2.583	1,5%

Tabla 7: Presencia de *Listeria monocytogenes* en hortalizas y frutas de IV gama y en ensaladas RTE de toda Europa entre los años 2016-2018 según los datos de EFSA 2017a, 2018a, 2019. Elaboración propia.

Los diferentes estudios de la EFSA en los productos de toda Europa mostraron que, en 2016, el 0,5% de las muestras de hortalizas y frutas RTE y, el 2% de las ensaladas RTE analizadas dieron positivo en cuanto a la presencia de *Listeria*. En 2017, ésta aumentó en ambos productos dando como resultado 0,6% en frutas y hortalizas RTE y 4,2% en ensaladas RTE. Y, por último, en 2018, la presencia en frutas y hortalizas RTE aumentó hasta el 1,8%, mientras que en ensaladas RTE disminuyó hasta el 1,5%.

Por otra parte, en los diferentes estudios llevados a cabo en alimentos de IV gama españoles (Tabla 8), también se obtuvieron valores bajos, lo que sugiere que la presencia de *L. monocytogenes* en estos alimentos es reducida.

Año	Producto		Presencia en 25 g	
			N.º de muestras	% muestras positivas
2018	Frutas y verduras RTE		434	0,46%
	Ensaladas RTE		497	7,85%
2017	Frutas y verduras RTE		345	1,16%
	Ensaladas RTE		711	0,14%
2016	Ensaladas RTE		591	0,5%
	Frutas y verduras RTE	En 25 g	221	0%
		En 100 g	108	1,85%

Tabla 8: Presencia de *L. monocytogenes* en alimentos de IV gama españoles entre los años 2016-2018 según los datos de EFSA, 2016, 2017b, 2018b. Elaboración propia.

Los datos obtenidos de la EFSA sobre la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos de IV gama entre los años 2016-2018 mostraron que, en 2016, en frutas y verduras RTE era de 1,85% (n= 2) en muestras de 100 g y de 0% en muestras de 25

g, siendo los productos que dieron positivo verduras RTE. En ensaladas se obtuvo una presencia del 0,5% (n= 3), en dos muestras había una concentración menor de 100 UFC/g y una contenía más de 100 UFC/g. En 2017, en las muestras recogidas de frutas y hortalizas la presencia de la bacteria en estos alimentos fue de 1,16% (n= 4), en tres sólo se detectó la presencia de *Listeria* y en una se observó que la concentración era menor a 100 UFC/g. Los datos referentes a ensaladas disminuyeron a 0,14% (n= 1) con respecto al año anterior. Y finalmente, en 2018, en productos de frutícolas y hortícolas RTE la presencia de *L. monocytogenes* era de 0,46% (n=2), siendo los productos que dieron positivo verduras con más de 100 UFC/g y menos de 100 UFC/g cada uno. En ensaladas RTE, aumentó con respecto al año anterior a 7,85% (n= 39), detectándose en 36 muestras que la concentración era menor a 100 UFC/g y, en el resto sólo se detectó su presencia.

Además, a partir de los datos recogidos de ese informe, también se ha podido determinar que la mayoría de las muestras que dieron positivo (82 %), se obtuvieron de productos que se encontraban en las plantas de procesamiento.

4.4 CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO

Este último paso de la evaluación de riesgos consiste en una combinación de la información obtenida de los otros apartados, es decir, se hace una estimación de la probabilidad de ocurrencia y severidad de la listeriosis basándose en la caracterización del peligro y la determinación de la exposición.

Con la información recogida a lo largo de la evaluación de riesgos se ha llegado a la conclusión de que, en primer lugar, puede haber una transmisión de *L. monocytogenes* a través de los alimentos de IV gama, pero, en segundo lugar, la probabilidad de desarrollar la listeriosis es baja.

Estos argumentos obedecen, en el primer caso a que:

- Según los informes realizados por la EFSA tras la recolección de muestras de diferentes alimentos de IV gama, hay evidencias de que *L. monocytogenes* está presente en los productos tras el procesamiento. Sin embargo, se ha podido ver que el porcentaje de muestras contaminadas es, mayoritariamente, bajo (<2%).
- *L. monocytogenes* puede sobrevivir y crecer en muchos de estos alimentos de IV gama si las condiciones de almacenamiento no son las adecuadas, tal es el caso de frutas como el melón o el coco u, hortalizas como la lechuga o

remolacha, que en caso de ser almacenados a temperaturas abusivas permiten el crecimiento de *Listeria*.

Y en el segundo es debido a que:

- En España, no se han descrito hasta el momento casos ni brotes asociados al consumo de alimentos de IV gama.
- El número de casos de listeriosis asociados a la consumición de estos alimentos de IV gama a nivel internacional son bajos.
- Según la evaluación de riesgos realizada por la FDA, los alimentos de IV gama están clasificados como productos de bajo riesgo en función del riesgo relativo de contraer listeriosis por el consumo de cada ración, al contrario que otros alimentos como los productos cárnicos o lácteos. Además, estimaron que el número de casos que aparecerían debido a su consumo era menor de 1 caso/año (FDA, 2003).

Aun así, se necesitarían más datos para hacer una evaluación de riesgos más precisa con respecto a la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos de IV gama.

5. CONCLUSIONES

Tras la evaluación de los diferentes alimentos de IV gama, se ha podido ver que la probabilidad de que *Listeria* esté presente en éstos o que, incluso se supere el límite microbiológico, de 100 UFC/g, establecido por el Reglamento (CE) no 2073/2005, es muy baja. Por tanto, se pueden clasificar como alimentos con un bajo potencial de transmisión de *Listeria* dado que la posibilidad de desarrollar listeriosis en caso de consumir este tipo de productos es baja. Este hecho queda respaldado también por el informe realizado por la FDA.

Por otro lado, a lo largo de la evaluación de riesgos, se ha podido ver que uno de los factores que aumenta la probabilidad de desarrollar listeriosis es la de pertenecer a uno de los grupos de riesgo junto con el consumo abundante de este tipo de alimentos. Con respecto a estos alimentos, se observa que son principalmente consumidos por una parte de la población de riesgo, es decir, los mayores de 65 años y, que incluso con concentraciones bajas de *L. monocytogenes* pueden desarrollar listeriosis invasiva. Por ello una propuesta para ser tomada en cuenta, podría ser la de su inclusión entre los alimentos a los que se le exige la aplicación del criterio de “tolerancia cero”, es decir, ausencia de la bacteria en 25 g de producto antes de que salga de la fábrica.

Con respecto a los factores que favorecen el crecimiento de la bacteria en estos alimentos, se ha podido ver que el control de la temperatura de almacenamiento es uno de los elementos más importantes a tener en cuenta para evitar que haya un crecimiento exponencial de la bacteria y que con ello, aumente la probabilidad de ingerir dosis altas. En este sentido, analizando más detenidamente los resultados obtenidos a partir de los estudios en los que se modificó la temperatura de almacenamiento, se ha podido determinar que los alimentos almacenados a temperaturas mayores de 5°C tendrán más riesgo asociado, incluso si se consume a lo largo de su vida útil, que aquellos productos que hayan sido almacenados a 4°C. Esto se debe a que a esta temperatura el crecimiento de *L. monocytogenes* es mucho más lento, por tanto, en caso de que esté presente la bacteria en el producto, se ingerirían dosis cuya probabilidad de que provocasen listeriosis en el consumidor sería baja.

A parte de la temperatura, se ha podido observar que el envasado de los productos en atmósferas modificadas aumenta el riesgo de desarrollar listeriosis. Esto se debe a que, como se mencionó antes, al verse inhibido el crecimiento de la flora

microbiana que impide el sobrecrecimiento de *Listeria*, en caso de que la bacteria esté presente en el producto, las características organolépticas de este se lo permitan y se conserven a temperaturas abusivas, *L. monocytogenes* crecerá durante el periodo de almacenamiento pudiendo llegar a alcanzar la dosis infectiva. Asimismo, si a esto se le suma que, no hay un deterioro del producto puesto que no hay crecimiento de la microbiota, si se consumiese fuera del periodo de vida útil, el riesgo de desarrollar listeriosis es mucho mayor, ya que *Listeria* ha tenido tiempo suficiente como para alcanzar dosis peligrosas.

En resumen, hay que respetar las recomendaciones que se dan en el etiquetado con respecto a las condiciones de conservación y la fecha de caducidad para que en caso de que la bacteria estuviese presente, no se multiplique hasta alcanzar niveles peligrosos para la salud.

Por último, cabe destacar que la búsqueda de información, con el fin de realizar la evaluación de riesgo de *L. monocytogenes* en alimentos de IV gama, pone de manifiesto que queda mucho por investigar en este campo, pues siguen existiendo vacíos que impiden la realización de evaluaciones de riesgo más precisas. Esto se deja ver, por ejemplo, en la falta de estudios que determinen las concentraciones exactas de *Listeria* en los alimentos en los que se detectó su presencia. Al igual que faltan datos más precisos sobre quienes consumen estos alimentos, ya que no se hace referencia expresa a otra de las poblaciones de riesgo, como son las embarazadas. Finalmente, también sería interesante que aumentaran los estudios de inoculación en diferentes productos tanto frutícolas como hortícolas. Esto abre sin duda la posibilidad de desarrollar esta línea de investigación a estos campos con el fin de evitar riesgos para la salud pública, principalmente, en las poblaciones de riesgo, derivados del consumo de estos alimentos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AESAN. (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios. *Revista del Comité Científico de la AESAN*(14), 43-59.
- AESAN. (s.f.). *Gestión de riesgos*. Recuperado el 22 de Junio de 2020, de http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/seccion/gestion_riesgos.htm
- AFSSA. (2008). *Technical Guidance Document. On shelf-life studies for Listeria monocytogenes in ready-to-eat-foods*. Maisons-Alfort, France.
- Álvarez-Ordóñez, A., Leong, D., Hickey, B., Beaufort, A., & Jordan, K. (2015). The challenge of challenge testing to monitor *Listeria monocytogenes* growth on ready-to-eat foods in Europe by following the European Commission (2014) Technical Guidance document. *Food Research International*, 75, 233-243. doi:10.1016/j.foodres.2015.06.004
- Baranyi, J., & Tamplin, M. (2004). ComBase: A Common Database on Microbial Responses to Food Environments. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1967–1971. doi:10.4315/0362-028x-67.9.1967
- Bover i Cid, S., & Garriga i Turón, M. (2014). *Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo*. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries.
- Cai, S., Worobo, R., & Snyder, A. (2019). Combined Effect of Storage Condition, Surface Integrity and Length of shelf life on the growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage microbiota on refrigerated ready-to-eat products. *Journal of Food Protection*, 82(8), 1423-1432. doi:10.4315/0362-028X.JFP-18-576
- Carrasco Jiménez, E. (2007). *Análisis del riesgo Microbiológico: Listeria monocytogenes en ensaladas de IV gama* (Doctora). Universidad de Córdoba.
- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R., & Zurera, G. (2007). Survey of temperature and consumption patterns of fresh-cut leafy. *Journal of Food Protection*, 70(10), 2407–2412. doi:10.4315/0362-028X-70.10.2407

- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R., & Zurera, G. (2010). Risk Assessment and Management of *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Lettuce Salads. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 498-512. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00123.x
- Cartwright, E., Jackson, K., Johnson, S., Graves, L., Silk, B., & Mahon, B. (2013). Listeriosis Outbreaks and Associated Food Vehicles, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(1), 1-9. doi:10.3201/eid1901.120393
- Comisión Europea (EC). (2005). Reglamento (CE) N° 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*, L338.
- Desai, A., Anyoha, A., Madoff, L., & Lassmann, B. (2019). Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of ProMED reports from 1996 to 2018. *International Journal of Infectious Diseases*, 84, 48-53. doi:10.1016/j.ijid.2019.04.021
- EFSA. (2016). *Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in foodstuffs, animals and feedingstuffs in 2016*. Obtenido de http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subseccion/vigilancia_zoonosis.htm
- EFSA. (2017a). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2016. *The EFSA Journal*, 15(12), 74. doi:10.2903/j.efsa.2017.5077
- EFSA. (2017b). *Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in foodstuffs, animals and feedingstuffs in 2017*. Obtenido de http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/control_oficial/Informe_fuentes_tendencias_Zoonosis_2017.pdf
- EFSA. (2018a). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), 83. doi:10.2903/j.efsa.2018.5500
- EFSA. (2018b). *Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in foodstuffs, animals and feedingstuffs in 2018*. Obtenido de http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/control_oficial/Informe_fuentes_tendencias_Zoonosis_2018.pdf

- EFSA. (2019). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2018. *EFSA Journal*, 17(12), 87. doi:10.2903/j.efsa.2019.5926
- Evaluación de riesgos*. (s.f.). Recuperado el 1 de Febrero de 2020, de Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN): http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/seccion/evaluacion_de_riesgos.htm
- FAO. (2001). *Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la evaluación de riesgos asociados a los peligros microbiológicos en los alimentos: Caracterización del riesgo de Salmonella spp. en huevos y pollos para asar y de Listeria monocytogenes en RTE*(72), 20. Roma, Italia.
- FAO & WHO. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Technical Report. *Microbiological Risk assessment series*(5).
- FAO & WHO. (2006). Food safety risk analysis. A guide for national food safety authorities. *FAO Food Nutrition Paper*, 87, 1-102.
- Farber, J., & Peterkin, P. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3), 476-511.
- FDA. (2003). *Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health from Foodborne Listeria monocytogenes Among Selected Categories of Ready-to-Eat-Foods*. doi:<https://www.fda.gov/media/124721/download>
- Feng, K., Hu, W., Jiang, A., Xu, Y., Sarengaowa, Li, X., & Bai, X. (2015). Growth Potential of *Listeria Monocytogenes* and *Staphylococcus Aureus* on Fresh-Cut Tropical Fruits. *Journal of Food Science*, 80(11), 2548-2554. doi:10.1111/1750-3841.13089
- García-Béjar Bermejo, B. (2014). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos listos para el consumo en España.
- García-Gimeno, R., & Zurera-Cosano, G. (1997). Determination of Ready-To-Eat Vegetable Salad Shelf-Life. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 31-38. doi:10.1016/s0168-1605(96)01238-x.
- Gil Muñoz, M., Allende , A., Beltrán Riquelme, D., & Selma, M. (2005). Nuevas Tendencias de Procesado y Conservación de Alimentos Vegetales de IV Gama. (C. T. Alimentación, Ed.) *AgroCSIC*, 146-151.
- Golden, M., McDonnell, L., Sheehan, V., Sindelar, J., & Glass, K. (2014). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Deli-Style Turkey Breast formulated with cultured

- celery powder and/or Cultured Sugar–Vinegar Blend during Storage at 4°C. *Journal of Food Protection*, 77(10), 1787-1793. doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-059
- Hanning, I., Johnson, M., & Rickie, S. (2008). Precut Prepackaged Lettuce: A Risk for Listeriosis? *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(6), 731-746. doi:10.1089/fpd.2008.0142
- Íñigo, S., & Jiménez, A. (2012). Guía de estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumo. *Documentos Técnicos de Higiene y Seguridad Alimentaria*, 6.
- ISCI, C. N. (2019). *Informe epidemiológico de listeriosis. Casos notificados a la RENAVE en los años 2015-2018*. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Obtenido de https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listerosis/docs/Informe_listeriosis-RENAVE_2808209.pdf
- Jofré, A., Latorre-Moratalla, M., Garriga, M., & Bover-Cid, S. (2019). Domestic Refrigerator Temperatures in Spain: Assessment of Its Impact on the Safety and Shelf-Life of Cooked Meat Products. *Food Research International*, 126. doi:10.1016/j.foodres.2019.108578
- Johnson, J., Doyle, M., & Cassens, R. (1990). *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products a review. *Journal Food Protection*, 53(1), 81-91. doi:10.4315/0362-028X-53.1.81
- La OMS y el Codex Alimentarius. (s.f.). Recuperado el 13 de Noviembre de 2019, de World Health Organization (WHO): https://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-standard/general_info/es/index2.html
- Lake, R., Hudson, A., Cressey, P., & Gilbert, S. (2005). *Risk Profile: Listeria monocytogenes in ready-to-eat salads*.
- Lammerding, A. (2013). Microbial Food Safety Risk Assessment. En J. Morris, & M. Potter (Edits.), *Foodborne infections and intoxication* (4ª ed., págs. 37-52). Amsterdam; Boston: Elsevier/AP.
- Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon, C., & Lecuit, M. (2019). *Listeria thailandensis* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(1), 74-81. doi:10.1099/ijsem.0.003097

- Lepe, J. A. (2020). Aspectos actuales de la listeriosis. *Medicina clínica*. doi:10.1016/j.medcli.2020.02.001
- Lianou, A., & N. Sofos, J. (2007). A Review of the Incidence and Transmission of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Products in Retail and Food Service Environments. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2172–2198. doi:10.4315/0362-028x-70.9.2172
- Lorber, B. (2007). Listeriosis. En H. Goldfine, & H. Shen (Edits.), *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response* (1ª ed., págs. 13-32). New York, USA: Springer. doi:10.1007/978-0-387-49376-3_2
- Manzo, N., Dertiano, D., Burgos, N., Gori, F., Staffolani, S. M., & Céspedes, J. M. (2015). Variables intrínsecas y aptitud comercial de zanahoria y radicheta mínimamente procesadas y conservadas a 5°C y 10°C. *Invenio: Revista de investigación académica*(35), 123-134.
- Marras, L., Carraro, V., Sanna, C., Sanna, A., Ingianni, A., & Coroneo, V. (2019). Growth of *Listeria monocytogenes* in ready to eat salads at different storage temperatures and valuation of virulence genes expression. *Annali di Igiene*, 31(4), 374-384. doi:10.7416/ai.2019.2299
- Martínez López, A., Cepeda Sáez, A., Herrera Marteache, A., & Andicoberry, C. (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 43-63.
- McCollum, J., Cronquist, A., Silk, B., Jackson, K., O'Connor, K., Cosgrove, S., . . . Mahon, B. (2013). Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. *The New England Journal of Medicine*, 369(10), 944-953. doi:10.1056/NEJMoa1215837
- McLauchlin, J., Mitchell, R., Smerdon, W., & Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), 15-33. doi:10.1016/S0168-1605(03)00326-X
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2018). *Informe del consumo alimentario en España 2018*.
- Noriega, E., Newman, J., Siggers, E., Robertson, J., Laca, A., Díaz, M., & Brocklehurst, T. (2010). Antilisterial activity of carrots: Effect of temperature and

- properties of different carrot fractions. *Food Research International*, 43(10), 2425-2431. doi:10.1016/j.foodres.2010.09.012
- Notermans, S., Dufrenne, P., Teunis, P., & Chackraborty, T. (1998). Studies on the Risk Assessment of *Listeria Monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 61(2), 244-248. doi:10.4315/0362-028x-61.2.244.
- Oliver, H. F., Wiedmann, M., & Boor, K. (2007). Environmental Reservoir and Transmission into the Mammalian Host. En H. Goldfine, & H. Shen (Edits.), *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response* (1^a ed., págs. 111-137). New York, USA: Springer. doi:10.1007/978-0-387-49376-3_6
- Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional. (2015). *Boletín Oficial del Estado*. (65), 24012-24015.
- Rocourt, J., BenEmbarek, P., Toyofuku, H., & Schlundt, J. (2003). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35(3), 263-267. doi:10.1016/S0928-8244(02)00468-6
- Sant'Ana, A., Barbosa, M., Destro, M., Landgraf, M., & Franco, B. (2012). Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 157(1), 52-58. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.011
- Self, J. L., Conrad, A., Stroika, S., Jackson, A., Whitlock, L., Jackson, K. A., Beal, J., Wellman, A., Fatica, M. K., Bidol, S., Huth, P. P., Hamel, M., Franklin, K., Tschetter, L., Kopko, C., Kirsch, P., Wise, M. E., & Basler, C. (2019). Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Packaged Leafy Green Salads, United States and Canada, 2015-2016. *Emerging infectious diseases*, 25(8), 1461–1468. <https://doi.org/10.3201/eid2508.180761>
- Tucci, P., Centorotola, G., Salini, R., Iannetti, L., Sperandii, A. F., D'Alterio, N., Migliorati, G., & Pomilio, F. (2019). Challenge test studies on *Listeria*

- monocytogenes* in ready-to-eat iceberg lettuce. *Food science & nutrition*, 7(12), 3845–3852. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1167>
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., & Kreft, J. (2001). *Listeria pathogenesis* and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 584–640. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001>
- Ziegler, M., Kent, D., Stephan, R., & Guldemann, C. (2019). Growth potential of *Listeria monocytogenes* in twelve different types of RTE salads: Impact of food matrix, storage temperature and storage time. *International Journal of Food Microbiology*, 296, 83-92. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.016
- Ziegler, M., Rüegg, S., Stephan, R., & Guldemann, C. (2018). Growth potential of *Listeria monocytogenes* in six different RTE fruit products: impact of food matrix, storage temperature and shelf life. *Italian Journal of Food Safety*, 7(3), 142-147. doi:10.4081/ijfs.2018.7581