



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

CONTROL DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN INDUSTRIAS CÁRNICAS

Alumno/a: **García Villasante, Natalia**

Tutor/a: Prof. D^a. Elena Ortega Morente

Dpto: Ciencias de la Salud

ÍNDICE

RESUMEN – ABSTRACT	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1. Sistemas de gestión de calidad y seguridad alimentaria	3
1.1.1 Sistema APPCC	5
1.1.2 Prácticas correctas de higiene	12
1.2. Principales patógenos alimentarios	14
2. OBJETIVOS	23
3. METODOLOGÍA	24
3.1. Criterios de seguridad alimentaria de productos cárnicos	24
3.2. Normas ISO	29
3.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	29
3.2.2 <i>Salmonella</i> spp.	31
3.2.3 <i>Campylobacter</i> spp.	31
3.2.4 <i>Clostridium perfringens</i>	32
3.2.5 <i>Echerichia coli</i>	32
3.3. Plan de trabajo	33
3.3.1 Cronograma	35
3.3.2 Plan financiero	36
4. OPORTUNIDAD DEL PROBLEMA PLANTEADO PARA LA ECONOMÍA, GRADO DE INNOVACIÓN DE LA PROPUESTA Y JUSTIFICACIÓN DEL POTENCIAL IMPACTO CIENTÍFICO Y/O TECNOLÓGICO	37
5. RESULTADOS ESPERADOS. PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN	38
6. MEMORIA ESPECÍFICA SOBRE EL IMPACTO INTERNACIONAL DEL PROYECTO	39
BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios y límites microbiológicos vigentes en la exportación de productos cárnicos a Japón. Fuente: Información específica sobre la exportación a Japón, Gobierno de España, pp. 1-4	22
Tabla 2. Criterios de seguridad alimentaria de productos cárnicos. Fuente: R (CE) nº 2073/2005 del Consejo, de 15 de noviembre de 2005	25
Tabla 3. Criterios de higiene de los procesos de productos cárnicos. Fuente: R (CE) nº 2073/2005 del Consejo, de 15 de noviembre de 2005	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de secuencias/árbol de decisiones para identificar los PCC. Fuente: Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) y Directrices para su Aplicación de la FAO (1997)	10
Figura 2. El sistema APPCC y su proceso de mantenimiento (Who, 1999). Fuente: La Comisión del programa de implantación de sistemas de autocontrol de la Comunidad de Madrid (2007)	11
Figura 3. Obra digital de <i>Listeria monocytogenes</i> . Fuente: FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS	16
Figura 4. Obra digital de <i>Salmonella</i> spp.. Fuente: FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS	16
Figura 5. Obra digital de <i>Aeromonas hydrophila</i> . Fuente: SciencePhotoLibrary	17
Figura 6. Obra digital de <i>Campylobacter</i> . Fuente: FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS	18
Figura 7. Obra digital de <i>Clostridium perfringens</i> . Fuente: FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS	18
Figura 8. Obra digital de <i>Echerichia coli</i> . Fuente: FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS	19
Figura 9. Obra digital de <i>Staphylococcus aureus</i> . Fuente: FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS	20
Figura 10. Obra digital de <i>Yersinia enterocolítica</i> . Fuente: iStock by Getty Images ...	20

RESUMEN

En pleno Siglo XXI y, pese al avance y las mejoras de maquinaria, técnicas y normativas del sector agroalimentario, es aún muy común la retirada de lotes de productos alimenticios por fallos en los procesos de control de la seguridad alimentaria.

Las inadecuadas prácticas de higiene y mejorables sistemas de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) ocasionan importantes intoxicaciones alimentarias a la población, además de una considerable pérdida económica tanto por la retirada del producto del mercado como por la generación de desconfianza en el consumidor.

Para evitar esto y garantizar una óptima seguridad alimentaria, el presente proyecto propone, a través de normas ISO, reforzar el sistema APPCC de una industria cárnica controlando el límite de microorganismos patógenos presentes en productos cárnicos una vez vencida la fecha de caducidad, a la vez que cumpliendo requisitos microbiológicos estrictos para poder exportar a Japón, con el consecuente beneficio económico.

PALABRAS CLAVE: Seguridad alimentaria, industria cárnica, producto cárnico, patógenos alimentarios, normas ISO, sistema APPCC.

ABSTRACT

In the 21st century, despite the progress and improvements in machinery, techniques and regulations in the food sector, it is still very common to recall batches of food products due to a lack of food safety.

Poor hygiene practices and inadequate Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) systems cause significant food poisoning in the population, as well as considerable economic loss due to both the withdrawal of the batch from the market and the generation of customer distrust.

To avoid these problems and to guarantee optimum food safety, this project proposes, through ISO standards, to reinforce the HACCP system of a meat industry by controlling the limit of pathogenic microorganisms present in meat products once the expiry date has passed, while complying with strict microbiological requirements in order to be able to export to Japan, with consequent benefits for this industry.

KEY WORDS: Food safety, meat industry, meat product, pathogenic bacteria, ISO standards, HACCP system.

1. ANTECEDENTES

“La seguridad alimentaria es una exigencia derivada de la Constitución Española, que consagra el derecho a la protección de la salud y otorga a los poderes públicos, competencia para organizar y tutelar la salud pública y les encomienda la defensa de los consumidores, protegiendo mediante procedimientos eficaces, la seguridad, la salud y los legítimos intereses de los mismos. Aunque desde hace casi un siglo existe una abundante legislación alimentaria, apenas han transcurrido cuarenta años desde que la sociedad ha tomado conciencia de la importancia de la seguridad alimentaria” (Doménech, 2013).

Los alimentos son esenciales para la vida, siendo la seguridad alimentaria un derecho humano básico de gran importancia. Las enfermedades y muertes transmitidas por los alimentos son una amenaza constante para la salud pública y suelen estar causadas por bacterias, virus, parásitos o toxinas (Choi et al., 2019; Shamloo et al., 2019). “La seguridad siempre se ha considerado como una característica intrínseca del producto, ya que era inconcebible clasificar un alimento como de calidad si éste podía causar un daño a la salud del consumidor. No obstante, las alertas alimentarias (encefalopatía espongiforme bovina (EEB), dioxinas, listeriosis, salmonelosis, etc.) acaecidas en la última década han minado la confianza de los consumidores en la seguridad de los productos alimenticios y han provocado que ambos conceptos se visualicen como dos requisitos casi independientes, pero que deben cumplirse en un mismo producto” (Doménech, 2013).

1.1. Sistemas de gestión de calidad y seguridad alimentaria

“Un sistema de gestión se define como una estructura organizativa en la que se detallan las responsabilidades, procesos, procedimientos, recursos, etc., que sirven de guía para hacer posible todas las actividades identificadas como necesarias y garantizar el alcance de los objetivos de cada uno de los sistemas, asegurando la calidad en las industrias”. Entre los principales beneficios que aportan se pueden destacar (Doménech, 2013):

- Mejora de la eficiencia en el empleo de sus propios recursos
- Mayor competitividad y confianza de sus clientes

- Mayor transparencia en cuanto al impacto de su actividad en el medioambiente, en la forma en que gestiona la seguridad, la calidad, y en general, como busca la mejora continua.

Dentro de los distintos sistemas de gestión de la industria agroalimentaria, se pueden diferenciar dos grandes grupos de sistemas (Doménech, 2013):

a) Sistemas de gestión obligatorios

Con el objetivo de garantizar la inocuidad de los alimentos, se encuentran:

- Requisitos previos de higiene y trazabilidad
- El sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC)

Ambos sistemas son obligatorios en todas las empresas de la cadena alimentaria, independientemente de su tamaño y en la distribución. Por otra parte, con la finalidad de garantizar el bienestar de los trabajadores y garantizar su seguridad en el ejercicio de su actividad, entra en vigor la Ley 31/1995 de 8 de noviembre de Prevención de Riesgos Laborales, que posteriormente se concreta con Reales Decretos, otras leyes y órdenes. Todos ellos tienen carácter obligatorio y, por lo tanto, es la administración la que se encarga de comprobar su implantación y eficacia.

b) Sistemas de gestión voluntarios

Son varios los sistemas que se pueden implantar en empresas agroalimentarias, por popularidad y exigencia de los mercados, destacan:

- Globalgap: se implanta en el sector primario hasta el momento en que el producto es retirado de la explotación.
- ISO 22000: es, en general, una norma que permite obtener un certificado del cumplimiento de todos los requisitos de buenas prácticas y del sistema APPCC siguiendo la estructura propuesta por el *Codex Alimentarius*.
- ISO 9001: su principal objetivo es garantizar la calidad de los productos en el sentido más amplio, es decir, en el que no se concibe un producto de calidad si no es seguro.
- British Retail Consortium (BRC): referente internacional que proporciona un marco de trabajo que permita la fabricación de alimentos seguros y de calidad que puedan satisfacer todas las exigencias de los clientes y consumidores.

- International Featured Standards (IFS): esquema de certificación promovido en Europa. Al igual que BRC, garantiza la calidad y seguridad de productos alimentarios, pero existen diferencias entre ambas, sobre todo en su estructura, auditoría y origen.
- EMAS o ISO 14001: establece procesos clave y objetivos para proteger el medioambiente de las operaciones realizadas en la empresa y que suelen afectar principalmente al sector primario y al de transformación.
- OHSAS: es el más empleado para alcanzar garantizar la seguridad y salud en el trabajo.

Por otro lado, la Comisión del programa de implantación de sistemas de autocontrol de la Comunidad de Madrid (2007) “considera esencial para la seguridad de los alimentos las prácticas correctas de higiene, que son complementarias e imprescindibles para la implantación efectiva de un sistema APPCC. Son un concepto análogo al de prerrequisitos, definidas como aquellas condiciones necesarias previamente y durante la implantación de un plan APPCC y que son esenciales para la seguridad de los alimentos, tal como definió la OMS en 1998”.

“Estas prácticas están descritas en los Principios Generales de Higiene de los Alimentos de la Comisión del *Codex Alimentarius* (CAC-RCP, 1969, rev. 4, 2003) y otros Códigos de Prácticas. También son descritas en el Reglamento (CE) 852/2004, de 29 de abril, de normas de higiene relativas a los productos alimenticios” (Comisión del programa de implantación de sistemas de autocontrol de la Comunidad de Madrid, 2007).

1.1.1 Sistema APPCC

Según el Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) y Directrices para su Aplicación de la FAO (1997) <http://www.fao.org/3/Y1579S/y1579s03.htm>, el sistema APPCC consiste en siete principios:

PRINCIPIO 1. Realizar un análisis de peligros.

PRINCIPIO 2. Determinar los puntos críticos de control (PCC).

PRINCIPIO 3. Establecer un límite o límites críticos.

PRINCIPIO 4. Establecer un sistema de vigilancia del control de los PCC.

PRINCIPIO 5. Establecer las medidas correctivas que han de adoptarse cuando la vigilancia indica que un determinado PCC no está controlado.

PRINCIPIO 6. Establecer procedimientos de comprobación para confirmar que el sistema de APPCC funciona eficazmente.

PRINCIPIO 7. Establecer un sistema de documentación sobre todos los procedimientos y los registros apropiados para estos principios y su aplicación.

Además, la FAO (1997) también propone distintas etapas para la aplicación de un sistema APPCC en una industria alimentaria:

a) Formación de un equipo de APPCC

Para lograr un plan de APPCC eficaz, la empresa alimentaria debe asegurar que se disponga de conocimientos y competencia específicos mediante la creación de un equipo multidisciplinario. Cuando no se disponga de servicios de este tipo *in situ*, deberá recabarse asesoramiento técnico de otras fuentes e identificarse el ámbito de aplicación, que determinará qué segmento de la cadena alimentaria está involucrado y qué categorías generales de peligros han de abordarse.

b) Descripción del producto

Debe formularse una descripción completa del producto que incluya información pertinente sobre su inocuidad, por ejemplo: composición, estructura física/química, tratamientos estáticos para la destrucción de los microbios, envasado, durabilidad, condiciones de almacenamiento y sistema de distribución.

c) Determinación del uso al que ha de destinarse

Debe basarse en los usos previstos del producto por parte del usuario o consumidor final. En casos concretos, hay que tener en cuenta si se trata de grupos vulnerables de la población.

d) Elaboración de un diagrama de flujo

El diagrama de flujo debe ser elaborado por el equipo de APPCC y cubrir todas las fases de la operación. Cuando éste se aplique a una determinada operación, hay que tener en cuenta las fases anteriores y posteriores a dicha operación.

e) Confirmación *in situ* del diagrama de flujo

El equipo de APPCC deberá cotejar el diagrama de flujo con la operación de elaboración en todas sus etapas y momentos, y enmendarlo cuando proceda.

f) Enumeración de todos los posibles riesgos relacionados con cada fase, ejecución de un análisis de peligros, y estudio de las medidas para controlar los peligros identificados

Se deben enumerar todos los peligros que puede razonablemente preverse que se producirán en cada fase, desde la producción primaria, la elaboración, la fabricación y la distribución, hasta el punto de consumo. Luego, se debe llevar a cabo un análisis de peligros para identificar, en relación con el plan de APPCC, cuáles son los peligros cuya eliminación o reducción a niveles aceptables resulta indispensable, por su naturaleza, para producir un alimento inocuo.

Al realizar un análisis de peligros, deberán incluirse, siempre que sea posible, factores como: la probabilidad de que surjan peligros y la gravedad de sus efectos perjudiciales para la salud; la evaluación cualitativa y/o cuantitativa de la presencia de peligros; la supervivencia o proliferación de los microorganismos involucrados; la producción o persistencia de toxinas, sustancias químicas o agentes físicos en los alimentos; y las condiciones que pueden originar lo anterior.

El equipo tiene entonces que determinar qué medidas de control, si las hay, pueden aplicarse en relación con cada peligro, pudiendo ser necesario aplicar más de una para controlar un peligro o peligros específicos, y que con una determinada medida se pueda controlar más de uno.

g) Determinación de los puntos críticos de control (PCC)

Puede que haya más de un PCC al que se apliquen medidas de control para hacer frente a un peligro específico. Esto se puede facilitar con la aplicación de un árbol de decisiones, como el mostrado en la **Figura 1**, donde se indique un enfoque de razonamiento lógico. (Este ejemplo de árbol de decisiones puede no ser aplicable a todas las situaciones, por lo que pueden usarse otros enfoques). El árbol de decisiones debe aplicarse de manera flexible, considerando si la operación se refiere

a la producción, el sacrificio, la elaboración, el almacenamiento, la distribución u otro fin, y debe utilizarse con carácter orientativo en la determinación de los PCC.

Si se identifica un peligro en una fase en la que el control es necesario para mantener la inocuidad, y no existe ninguna medida de control que pueda adoptarse en esa fase o en cualquier otra, el producto o el proceso debe modificarse en esa fase, o en cualquier fase anterior o posterior, para incluir una medida de control.

h) Establecimiento de límites críticos para cada PCC

Para cada punto crítico de control, deben especificarse y validarse, si es posible, límites críticos. En algunos casos, para una determinada fase, se elaboran más de un límite crítico. Entre los criterios aplicados suelen figurar las mediciones de temperatura, tiempo, nivel de humedad, pH, actividad de agua y cloro disponible, así como parámetros sensoriales como el aspecto y la textura.

i) Establecimiento de un sistema de vigilancia para cada PCC

La vigilancia es la medición u observación programadas de un PCC en relación con sus límites críticos. Mediante los procedimientos de vigilancia debe poderse detectar una pérdida de control en el PCC. Además, lo ideal es que la vigilancia proporcione esta información a tiempo como para hacer correcciones que permitan asegurar el control del proceso para impedir que se infrinjan los límites críticos.

Cuando sea posible, los procesos deben corregirse cuando los resultados de la vigilancia indiquen una tendencia a la pérdida de control en un PCC, y las correcciones deberán efectuarse antes de que ocurra una desviación. Los datos obtenidos gracias a la vigilancia deben ser evaluados por una persona designada que tenga los conocimientos y la competencia necesarios para aplicar medidas correctivas.

Si la vigilancia no es continua, su grado o frecuencia deben ser suficientes como para garantizar que el PCC esté controlado. La mayoría de los procedimientos de vigilancia de los PCC deben efectuarse con rapidez porque se refieren a procesos continuos y no hay tiempo para ensayos analíticos prolongados.

Con frecuencia se prefieren las mediciones físicas y químicas a los ensayos microbiológicos porque pueden realizarse rápidamente y a menudo indican el control microbiológico del producto. Todos los registros y documentos relacionados con la

vigilancia de los PCC deben ser firmados por la persona o personas que efectúan la vigilancia, junto con el funcionario o funcionarios de la empresa encargados de la revisión.

j) Establecimiento de medidas correctivas

Para paliar las desviaciones que se puedan producir, se deben formular medidas correctivas específicas para cada PCC del sistema APPCC. Estas medidas deben asegurar que el PCC vuelve a estar controlado e incluyen un sistema adecuado de eliminación del producto afectado. Los procedimientos relativos a las desviaciones y la eliminación de los productos deben documentarse en los registros de APPCC.

k) Establecimiento de procedimientos de comprobación

Para determinar si el sistema APPCC funciona eficazmente, pueden utilizarse métodos, procedimientos y ensayos de comprobación y verificación, incluidos el muestreo aleatorio y el análisis. La frecuencia de las comprobaciones debe ser suficiente para confirmar que el sistema está funcionando eficazmente.

Las actividades de comprobación son, entre otras: examen del sistema APPCC y de sus registros; examen de las desviaciones y los sistemas de eliminación del producto; y confirmación de que los PCC se mantienen bajo control.

l) Establecimiento de un sistema de documentación y registro

En un sistema de registro eficaz y preciso, deben documentarse los procedimientos del sistema de APPCC, que debe ajustarse a la naturaleza y magnitud de la operación en cuestión.

Algunos ejemplos de documentación son: análisis de peligros; determinación de los PCC; y determinación de los límites críticos. Como ejemplos de registros se pueden mencionar: actividades de vigilancia de los PCC; desviaciones y las medidas correctivas correspondientes; y modificaciones introducidas en el sistema de HACCP.

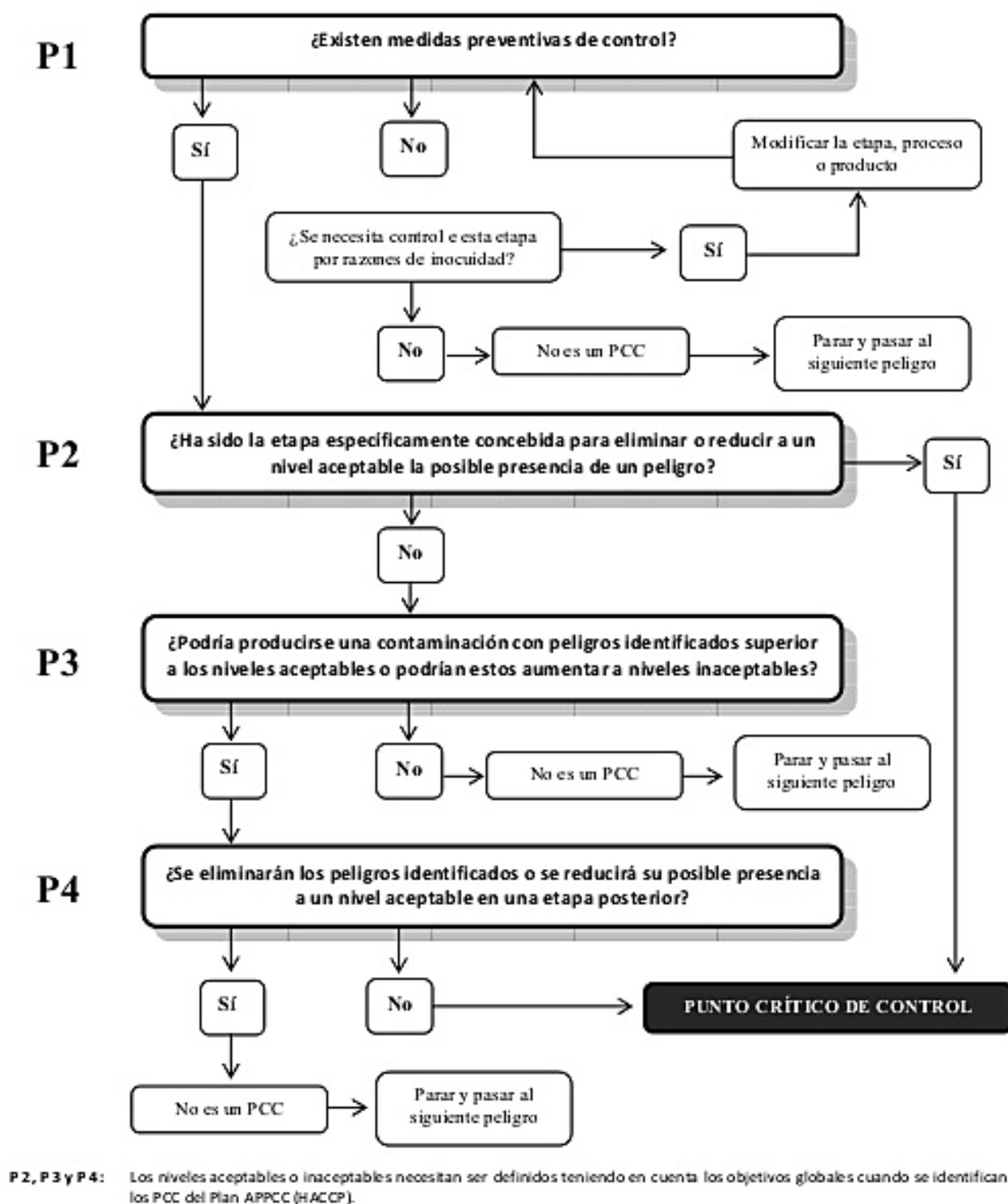


Figura 1. Ejemplo de secuencias/árbol de decisiones para identificar los PCC. Fuente: Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) y Directrices para su Aplicación de la FAO (1997).

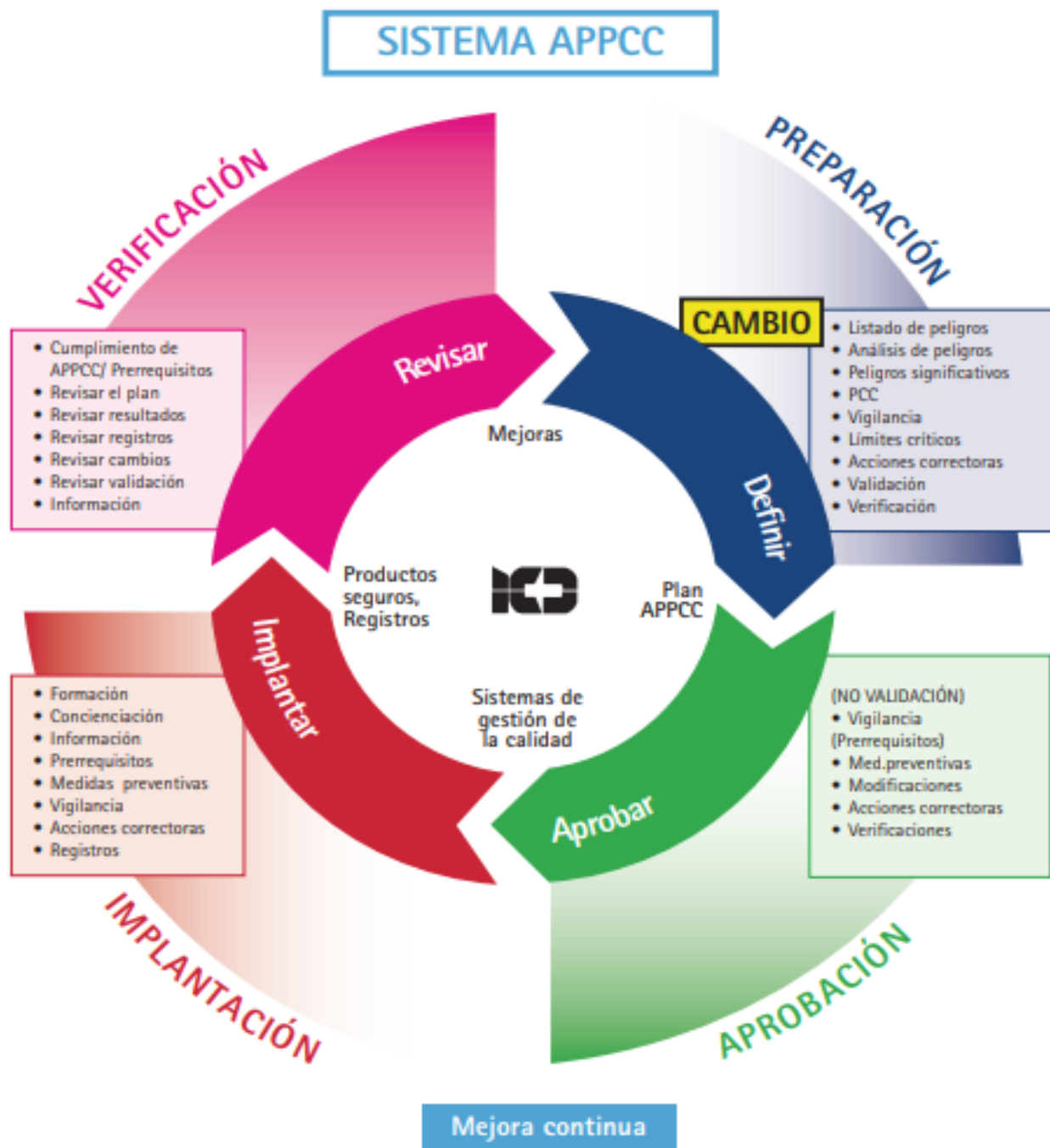


Figura 2. El sistema APPCC y su proceso de mantenimiento (Who, 1999). Fuente: La Comisión del programa de implantación de sistemas de autocontrol de la Comunidad de Madrid (2007).

1.1.2 Implantación de prácticas correctas de higiene

La Comisión del programa de implantación de sistemas de autocontrol de la Comunidad de Madrid (2007) define los pasos necesarios a seguir para la implantación de prácticas correctas de higiene:

a) Implantación del plan de formación de trabajadores

La formación es fundamental para garantizar una adecuada higiene de los alimentos y servir al consumidor alimentos inocuos y seguros. Deficiencias en la formación de los manipuladores de alimentos o en su puesta en práctica representa una amenaza para la seguridad de los alimentos.

Este paso va dirigido a todas las personas que participan o que tienen responsabilidad en las operaciones relacionadas con los alimentos tengan la formación y el entrenamiento adecuado a su puesto de trabajo, desempeñándolo conforme a las instrucciones establecidas en el programa de formación de la empresa y demostrando su efectividad.

b) Implantación del plan de mantenimiento de locales, instalaciones y equipos

Para evitar y controlar los distintos peligros en la producción de alimentos es condición imprescindible que existan, funcionen y se conserven adecuadamente todas aquellas infraestructuras y recursos materiales de interés.

Se dirige a los edificios, instalaciones, maquinaria y equipos, que tengan relación con los alimentos, están emplazados, diseñados, contruidos, utilizados y mantenidos de forma que contribuyen a la puesta en el mercado de alimentos seguros. El plan establecido para ello se cumplirá, será eficaz y existirán registros que lo garanticen.

c) Implantación del plan de limpieza y desinfección

Es un paso esencial para un control eficaz de los peligros que afectan a los alimentos. Asegurar una limpieza y desinfección eficaz de instalaciones y equipos, conforme a la documentación establecida, que permita la producción de alimentos seguros.

d) Implantación del plan de control de plagas: desinsectación y desratización

Posibilitan un control eficaz de peligros asociados a insectos y roedores para la seguridad de los alimentos, además de evitar pérdidas económicas en la empresa alimentaria por deterioros de infraestructuras y productos.

e) Implantación del plan de control del agua de abastecimiento

Establecer sistemas eficaces que aseguren que el agua destinada a estar en contacto con los alimentos o equipos sea agua potable, evitando así una posible contaminación de los alimentos.

f) Implantación del plan de buenas prácticas de fabricación y manipulación

Producir alimentos inocuos y aptos para el consumo humano sustentado en un adecuado control de las operaciones realizadas en la empresa alimentaria, mediante:

- La formulación y cumplimiento de requisitos relativos al personal, materias primas y material auxiliar, composición, elaboración, distribución, transporte y consumo requeridos en la fabricación y manipulación de los diferentes productos alimenticios, así como a la gestión de residuos y subproductos generados
- La formulación, aplicación y evaluación de sistemas de control eficaces.

Contribuye a la prevención y control de los riesgos que afectan a la seguridad de los alimentos. Al mismo tiempo contribuye a una mayor calidad en los alimentos y una mejora de las prácticas comerciales.

g) Implantación del plan trazabilidad

Aporta credibilidad y eficacia al sistema de control de la seguridad de los alimentos a lo largo de la cadena alimentaria, a través de la información relevante asociada a la producción de un producto alimenticio.

Cuando aparece un problema en un producto alimenticio, disponer de información suficiente y relevante de su historia, desde el productor al consumidor, y dentro de la empresa alimentaria desde que entra el producto hasta que sale de sus instalaciones, facilita su localización, la identificación de las causas que lo motivaron y ayuda a adoptar acciones correctoras y la localización y retirada del mercado en su caso. Además, la legislación establece la obligación de poner en marcha, aplicar y mantener un sistema de trazabilidad.

h) Implantación del plan de residuos químicos en mataderos

Permite un control eficaz de los peligros asociados a la presencia de residuos de sustancias químicas en la carne, siendo los mataderos el primer establecimiento de transformación de la cadena alimentaria para la obtención de productos derivados de la carne, asumiendo así el sector su responsabilidad en lo que respecta a la seguridad de los productos de origen cárnico con destino al consumo humano.

Así se evita la presencia en la carne de residuos derivados de tratamientos a los animales y de medicamentos veterinarios, así como de plaguicidas y contaminantes medioambientales en una cantidad superior a los Límites Máximos de Residuos establecidos en la normativa vigente.

i) Otras prácticas correctas de higiene

Como la producción de alimentos seguros necesita de una base sólida de condiciones y prácticas higiénicas, pueden incluirse otros programas de prerequisites, que una vez documentados deben ser igualmente implantados.

1.2. Principales patógenos alimentarios

“Se calcula que 600 millones de personas en el mundo enferman tras consumir alimentos contaminados y 420000 mueren cada año, siendo los niños menores de 5 años los que soportan el 40% de la carga de este tipo de enfermedades, con 125000 muertes al año” (Gizaw, 2019). Según Shamloo et al. (2019), el riesgo de enfermedades transmitidas por los alimentos ha aumentado durante las últimas dos décadas, a pesar de las mejoras en la producción alimentaria. Es por eso que, para garantizar la seguridad alimentaria y evitar así enfermedades innecesarias, es esencial la detección rápida y precisa de agentes patógenos, siendo los principales responsables los productores, distribuidores, manipuladores y vendedores de alimentos. La estrecha colaboración entre estos junto con los organismos gubernamentales y las legislaciones vigentes, garantizará la seguridad alimentaria del Siglo XXI (Fung et al., 2018).

“Los animales destinados a la alimentación son los principales reservorios de muchos patógenos bacterianos zoonóticos transmitidos por los alimentos, y los productos alimenticios de origen animal son los principales vehículos de transmisión.

La carne, los productos lácteos y los huevos son las principales vías de exposición de las personas a las bacterias zoonóticas” (Abebe et al., 2020).

Los patógenos bacterianos de transmisión alimentaria más importantes asociados a la carne son *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolítica*. Estas bacterias causan infecciones humanas caracterizadas principalmente por síntomas gastrointestinales que incluyen náuseas, vómitos, diarrea o calambres abdominales. Además, las especies de *Pseudomonas* se asocian al deterioro de la carne causando olores, sabores, decoloración y producción de gas; las de *Vibrio* son la principal causa de infección de heridas y septicemia en humanos; y, otras bacterias, pueden causar complicaciones severas (Bantawa et al., 2018; Abebe et al., 2020).

“*L. monocytogenes* se caracteriza por ser una bacteria grampositiva psicotrófica, anaerobia facultativa, con forma de bastón, móvil, que no forma esporas. Patógeno intracelular facultativo capaz de crecer a temperaturas entre 0 y 45°C, de soportar pH entre 4,4 y 9,4, y de requerir una actividad de agua mínima de 0,92. Todas estas características le proporcionan una gran capacidad de desarrollo en condiciones de almacenamiento de los alimentos que impiden el crecimiento de la mayoría de los patógenos alimentarios. Se encuentra comúnmente en alimentos crudos como verduras o productos animales. *L. monocytogenes* posee factores de virulencia únicos para invadir al huésped, evadir las células inmunitarias, atravesar la membrana intestinal y entrar en el torrente sanguíneo. La bacteria se transmite por la sangre (septicemia) y puede crecer después de entrar en los monocitos, macrófagos o leucocitos polimorfonucleares del huésped, causando infección” (Abebe et al., 2020).

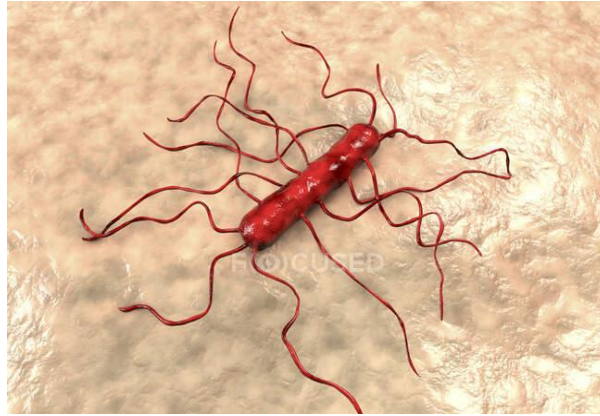


Figura 3. Obra digital de *Listeria monocytogenes*. Fuente: FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS, <https://focusedcollection.com/sp/stock-photos/listeriamonocytogenes.html?iv=389315996>.

Por otro lado, “*Salmonella* spp. es gramnegativa, con forma de varilla recta, anaerobia facultativa, no forma esporas. Existe una creciente preocupación por la aparición y propagación de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos. Factores como la virulencia de la cepa, la dosis infecciosa, la vía de infección y la susceptibilidad del huésped median en la patogenicidad del organismo. El hábitat principal de este patógeno es el tracto intestinal de los animales, como los de granja, los humanos, las aves, los reptiles y los insectos. *Salmonella* evita la defensa del huésped en el estómago, llega al intestino e interactúa con las células no fagocíticas, como las células epiteliales de la mucosa intestinal. Se adhiere a estas mediante fimbrias (estructuras adhesivas) que promueven la unión e invaden las células epiteliales para provocar infección” (Abebe et al., 2020).



Figura 4. Obra digital de *Salmonella* spp. Fuente: FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS, <https://focusedcollection.com/sp/stock-photos/salmonella.html?iv=160166370>.

"*A. hydrophila* se caracteriza por ser gramnegativa, anaerobia facultativa, móvil, oxidasa positiva, no forma esporas, pertenece a la familia *Aeromonadaceae*. Se encuentra mayoritariamente en ambientes acuáticos y alimentos de origen animal. Produce factores de virulencia multifuncionales, incluyendo características estructurales relacionadas con la adhesión, el ataque celular y el escape del proceso de fagocitosis, y ciertos factores extracelulares, como la aerolisina, que conduce a la lisis y toxicidad de las células. Existe una creciente resistencia de *A. hydrophila* a antibióticos como la amoxicilina, la carbenicilina y la ticarcilina" (Elbehiry et al., 2019).



Figura 5. Obra digital de *Aeromonas hydrophila*. Fuente: SciencePhotoLibrary, <https://www.sciencephoto.com/media/1020917/view/aeromonas-hydrophila-bacteria-sem>.

"*Campylobacter* es gramnegativa curvada o en espiral, microaerófila, catalasa y oxidasa positiva, con una motilidad distintiva de "dardo", pertenece a la familia *Campylobacteriaceae*. Puede encontrarse en los órganos reproductores, el tracto intestinal y la cavidad oral de animales y humanos. Varios factores de virulencia putativos contribuyen a su motilidad, adhesión intestinal, colonización, producción de toxinas e invasión. Además, la bacteria produce varias citotoxinas que coadyuvan al desarrollo de la enfermedad" (Abebe et al., 2020).



Figura 6. Obra digital de *Campylobacter*. Fuente: FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS, <https://focusedcollection.com/sp/stock-photos/campylobacter.html?iv=161674028>.

Por otra parte, “*C. perfringens* es un bacilo grampositivo anaerobio, formador de esporas, pertenece a la familia *Clostridaceae*. Se encuentra formando parte de la microbiota gastrointestinal de seres humanos y animales, tanto enfermos como sanos. Su patogenicidad radica en la secreción de más de 20 toxinas y enzimas identificadas como principales factores de virulencia” (Kiu & Hall, 2018).



Figura 7. Obra digital de *Clostridium perfringens*. Fuente: FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS, <https://focusedcollection.com/sp/stock-photos/clostridium.html?iv=199523062>.

"*E. coli* se describe como bacteria gramnegativa con forma de bastón, móvil, con flagelos peritricos y a menudo fimbriados, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria puede fermentar la glucosa y otros azúcares y, normalmente, forma parte de la microbiota intestinal de muchos animales sanos, incluidos los humanos. Sin embargo, algunas cepas pueden causar enfermedades debido a sus mecanismos de patogenicidad como los factores de virulencia, la toxina tipo Shiga y los factores de adherencia" (Abebe et al., 2020).



Figura 8. Obra digital de *Echerichia coli*. Fuente: FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS, <https://focusedcollection.com/sp/stock-photos/coli.html?iv=160217762>.

Mientras que "*S. aureus* es un coco grampositivo anaerobio facultativo, no móvil, catalasa y coagulasa positivo, generalmente oxidasa negativo, que pertenece a la familia *Micrococcaceae*. Alrededor del 50% de los individuos sanos albergan esta bacteria en las fosas nasales, la garganta y la piel. Patógeno capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas (de 7°C a 48°C, con un óptimo de 30°C a 37°C), de pH (de 4,2 a 9,3, con un óptimo de 7,0 a 7,5) y de concentraciones de cloruro sódico (hasta el 15% de NaCl), lo que le otorga una alta probabilidad de supervivencia. Además, puede expresar una gran variedad de factores de virulencia como coagulasa, hemolisinas o enterotoxinas, que promueven la adhesión a los componentes de la matriz extracelular, el daño celular y la lucha contra el sistema inmunitario del huésped" (Abebe et al., 2020).



Figura 9. Obra digital de *Staphylococcus aureus*. Fuente: FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS, <https://focusedcollection.com/sp/stock-photos/aureus.html?iv=160225366>.

Por último, “*Y. enterocolítica* es un cocobacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, no formador de esporas, con flagelos peritricos, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Patógeno psicotrópico capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas (de 0°C a 45°C, con un óptimo de 25°C a 30°C), de pH (de 4,0 a 10,0, con un óptimo de 7,6) y de concentraciones de cloruro sódico (hasta el 5% de NaCl). La toxina que produce *Y. enterocolítica* es estable al calor, resiste la degradación enzimática, permanece estable durante el almacenamiento prolongado y tiene una estabilidad elevada para un amplio rango de pH” (Bintsis, 2017).



Figura 10. Obra digital de *Yersinia enterocolítica*. Fuente: iStock by Getty Images, <https://www.istockphoto.com/es/foto/bacteria-de-la-yersinia-enterocol%C3%ADtica-gm986043466-267491505>.

Así pues, el estudio de Abebe et al. (2020) reveló que “las técnicas convencionales de cultivo, serológicas y moleculares son importantes para la detección de estas bacterias zoonóticas comunes y sus toxinas en los alimentos. Una

adecuada higiene, unas buenas prácticas de fabricación, el saneamiento en los procedimientos operativos y la aplicación de procedimientos estandarizados de APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico) y pasteurización, son métodos eficaces para el control y la prevención”.

La falta de control en alguna de estas técnicas o procesos ha traído consigo alertas alimentarias relacionadas con productos cárnicos como la presencia de *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium en “Fuet Cabanes” (septiembre 2020) o la presencia de *Listeria monocytogenes* en distintos alimentos: en medallones de bloc de pato y foie (enero 2020), en varios productos cárnicos procedentes de Alemania de la marca “Casa Westfalia” (octubre 2020), en chicharrones y carne mechada de la marca “La Montanera del Sur” (septiembre 2019), en carne mechada de “Sabores de Paterna” (septiembre 2019), en distintos productos cárnicos de “La Mechá” (agosto 2019), en carne mechada fabricada por Magrudis S.L. y comercializada por Comercial Martínez León (agosto 2019), en pollo chino de la marca Oriental Express (julio 2018) o en mousse de foie (marzo 2018). Todas ellas recogidas y publicadas por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

El presente proyecto pretende conseguir que alimentos como los mencionados anteriormente sean inocuos, para ello se basa en la legislación vigente, concretamente 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, por el cual se establecen pautas para la toma de muestras y límites permitidos en los análisis por tipos de alimentos.

Asimismo, se emplearán como metodologías básicas las normas ISO alimentarias, normas estandarizadas que definen los requisitos que debe cumplir un sistema de gestión de seguridad alimentaria para asegurar la inocuidad de los alimentos a lo largo de toda la cadena alimentarias desde la “granja hasta la nevera”.

Es por todo esto por lo que surge la necesidad de llevar a cabo el presente proyecto de investigación, pudiendo así asegurar un óptimo control de técnicas y procesos llevados a cabo durante la obtención de productos cárnicos, así como la garantía de ausencia o relativa presencia, dentro de los parámetros legales establecidos, de microorganismos patógenos en dichos alimentos. De esta forma, se garantizará una disminución significativa tanto en número de intoxicaciones

alimentarias como en pérdidas económicas por parte de las empresas a causa de alertas alimentarias que comprometan la confianza de los consumidores en sus productos.

Según Doménech (2013), “la integración y concentración de los sectores alimentarios y la globalización del comercio de alimentos están cambiando las pautas de producción y distribución de los alimentos. Los productos destinados a la alimentación humana y animal llegan hasta lugares mucho más distantes que en el pasado, lo que propicia condiciones favorables que permiten la difusión de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos”. Por ello, este proyecto sería de gran interés en cuanto a exportación internacional, pudiendo proporcionar datos atractivos sobre cantidades microbianas ínfimas presentes en alimentos a países extranjeros como Japón, donde sus empresas son muy estrictas en cuanto a estos parámetros (**Tabla 1**). Así pues, las industrias alimentarias españolas se beneficiarían de manera notoria tanto a nivel económico como reputacional por tener la oportunidad de dar a conocer la calidad y seguridad de sus productos.

Tabla 1. Criterios y límites microbiológicos vigentes en la exportación de productos cárnicos a Japón. Fuente: Información específica sobre la exportación a Japón, Gobierno de España, pp. 1-4. <https://www.mschs.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/JaponProcedEspAves.pdf>

	Productos cárnicos secos ⁽¹⁾	Productos cárnicos sin calentar	Productos cárnicos calentados
<i>Listeria monocytogenes</i>	R (CE) 2073/2005	R (CE) 2073/2005	R (CE) 2073/2005
<i>Salmonella</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
<i>Clostridium</i> spp.	-	-	< 1000 ufc/g ⁽²⁾
<i>E. coli</i> spp.	Ausencia	< 100 ufc/g	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	< 1000 ufc/g	< 1000 ufc/g ⁽³⁾

⁽¹⁾ Productos con Aw inferior a 0.87.

⁽²⁾ No es necesario investigar su presencia si el producto se envasa después de aplicar el tratamiento térmico.

⁽³⁾ No es necesario investigar su presencia si el producto se somete a un tratamiento térmico, que elimine al microorganismo, en su envase final.

2. OBJETIVOS

Acontecimientos recientes como el aumento de intoxicaciones alimentarias, el desenlace fatal de muchas de ellas y las pérdidas económicas que conllevan, hace que surja la necesidad de optimizar los sistemas de control de seguridad alimentaria vigentes para hacerlos más eficaces, concretamente los de industrias de productos cárnicos, cuya incidencia es mayor. Así pues, el objetivo principal de este proyecto es el control de microorganismos patógenos en industrias cárnicas.

Este objetivo general se desarrolla en varios objetivos específicos:

1. Establecer mecanismos eficaces de control de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*.
2. Establecer mecanismos eficaces de control de seguridad alimentaria para *Salmonella* spp.
3. Establecer mecanismos eficaces de control de seguridad alimentaria para *Clostridium perfringes*.
4. Obtener requisitos microbiológicos óptimos para la exportación a Japón de productos cárnicos.

3. METODOLOGÍA

3.1. Criterios de seguridad alimentaria de productos cárnicos

Según el Reglamento (CE) nº 2073/2005 del Consejo, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, “uno de los objetivos fundamentales de la legislación alimentaria es asegurar un nivel elevado de protección de salud pública, por eso se establecen principios y requisitos generales en la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la misma”.

“Los riesgos microbiológicos de los productos alimenticios constituyen una de las principales fuentes de enfermedades de origen alimentario para las personas, por lo que no deben contener microorganismos ni sus toxinas o metabolitos en cantidades que supongan un riesgo inaceptable para la salud humana”.

El R (CE) nº 2073/2005 del Consejo, de 15 de noviembre de 2005, establece los criterios microbiológicos para determinados microorganismos y las normas de aplicación que deben cumplir los explotadores de empresas alimentarias al aplicar las medidas de higiene generales y específicas. La autoridad competente verificará el cumplimiento de las normas y los criterios establecidos en el presente Reglamento conforme a lo establecido en el Reglamento (CE) no 882/2004, sin perjuicio de su derecho a realizar más muestreos y análisis con el fin de detectar y medir otros microorganismos, sus toxinas o metabolitos, ya sea a efectos de verificar procesos, en el caso de alimentos de los que se sospecha no sean seguros, o en el contexto de un análisis de riesgo.

Este Reglamento es la base de los métodos que se aplican en el presente proyecto para estimar la aceptabilidad de los productos cárnicos que se van a evaluar. La **Tabla 2** muestra los criterios de seguridad alimentaria y la **Tabla 3** los criterios de higiene de los procesos, ambas para productos cárnicos.

Tabla 2. Criterios de seguridad alimentaria de productos cárnicos. Fuente: R (CE) nº 2073/2005 del Consejo, de 15 de noviembre de 2005.

Categoría de alimentos	Microorganismos/sus toxinas, metabolitos	Plan de toma de muestras ⁽¹⁾		Límites ⁽²⁾		Método analítico de referencia ⁽³⁾	Fase en la que aplica el criterio
		n	c	m	M		
Carne picada y preparados de carne destinados a ser consumidos crudos	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
Carne picada y preparados de carne a base de carne de aves de corral destinados a ser consumidos cocinados	<i>Salmonella</i>	5	0	Desde el 1.1.2006 Ausencia en 10 g Desde el 1.1.2010 Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
Carne picada y preparados de carne a base de especies distintas a las aves de corral destinados a ser consumidos cocinados	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 10 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
Carne separada mecánicamente (CSM) ⁽⁴⁾	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 10 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
Productos cárnicos destinados a ser consumidos crudos, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto elimine el riesgo de salmonela	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
Productos cárnicos hechos a base de carne de aves de corral, destinados a ser consumidos cocinados	<i>Salmonella</i>	5	0	Desde el 1.1.2006 Ausencia en 10 g Desde el 1.1.2010 Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil

⁽¹⁾ n = número de unidades que componen la muestra; c = número de unidades de muestreo con valores superiores a m o comprendidos entre m y M.

⁽²⁾ Para los criterios comprendidos entre los puntos 1.1 y 1.24, ambos inclusive, se entenderá que m=M.

⁽³⁾ Se utilizará la última versión de la norma.

⁽⁴⁾ Este criterio se aplica a la carne separada mecánicamente (CSM) producida con las técnicas contempladas en el anexo III, sección V, capítulo III, apartado 3, del Reglamento (CE) no 853/2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

Tabla 3. Criterios de higiene de los procesos de productos cárnicos. Fuente: R (CE) nº 2073/2005 del Consejo, de 15 de noviembre de 2005.

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de toma de muestras ⁽¹⁾		Límites ⁽²⁾		Método analítico de referencia ⁽³⁾	Fase en la que aplica el criterio	Acción en caso de resultados insatisfactorios
		n	c	m	M			
Canales bovinas, ovinas, caprinas y equinas ⁽⁴⁾	Recuento de colonias aerobias			3,5 log ufc/cm ² media logarítmica diaria	5,0 log ufc/cm ² media logarítmica diaria	ISO 4833	Canales después de su faenado pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso
	<i>Enterobacteriaceae</i>			1,5 log ufc/cm ² media logarítmica diaria	2,5 log ufc/cm ² media logarítmica diaria	ISO 21528-2	Canales después de su faenado pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso
Canales porcinas ⁽⁴⁾	Recuento de colonias aerobias			4,0 log ufc/cm ² media logarítmica diaria	5,0 log ufc/cm ² media logarítmica diaria	ISO 4833	Canales después de su faenado pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso
	<i>Enterobacteriaceae</i>			2,0 log ufc/cm ² media logarítmica diaria	3,0 log ufc/cm ² media logarítmica diaria	ISO 21528-2	Canales después de su faenado pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso
Canales bovinas, ovinas, caprinas y equinas	<i>Salmonella</i>	50 ⁽⁵⁾	2 ⁽⁶⁾	Ausencia en la zona examinada por el canal		EN/ISO 6579	Canales después de su faenado pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio, revisión de los controles del proceso y del origen de los animales

Canales porcinas	<i>Salmonella</i>	50 ⁽⁵⁾	5 ⁽⁶⁾	Ausencia en la zona examinada por el canal		EN/ISO 6579	Canales después de su faenado pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso, del origen de los animales y de las medidas de bioseguridad en las explotaciones de origen
Canales de pollos de carne y pavos	<i>Salmonella</i>	50 ⁽⁵⁾	7 ⁽⁶⁾	Ausencia en 25 g de una muestra conjunta de piel del cuello		EN/ISO 6579	Canales tras el enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso, del origen de los animales y de las medidas de bioseguridad en las explotaciones de origen
Carne picada	Recuento de colonias aerobias ⁽⁷⁾	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁶ ufc/g	ISO 4833	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas
	<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas
Carne separada mecánicamente (CSM) ⁽⁹⁾	Recuento de colonias aerobias	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁶ ufc/g	ISO 4833	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas
	<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas
Preparados de carne	<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	5	2	500 ufc/g o cm ²	5000 ufc/g o cm ²	ISO 16649-1 o 2	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas

- (¹) n = número de unidades que componen la muestra; c = número de unidades de muestreo que dan valores entre m y M.
- (²) Para los criterios comprendidos entre los puntos 2.1.3 y 2.1.5, se entenderá que m=M.
- (³) Se utilizará la última versión de la norma.
- (⁴) Los límites (m y M) sólo se aplican a las muestras obtenidas por el método destructivo. La media logarítmica diaria se calcula tomando primero un valor logarítmico de cada resultado de prueba individual y calculando la media de dichos valores.
- (⁵) Las 50 muestras proceden de diez sesiones consecutivas de muestreo, conforme a las normas y frecuencias de muestreo establecidas en el presente Reglamento.
- (⁶) El número de muestras cuando se detecta la presencia de salmonela. El valor c está sujeto a revisión con el fin de tener en cuenta los progresos obtenidos en la reducción de la prevalencia de salmonela. Los Estados miembros o las regiones que tengan baja prevalencia de salmonela podrán usar valores c inferiores incluso antes de la revisión.
- (⁷) Este criterio no se aplica a la carne picada producida al por menor cuando la vida útil del producto es inferior a 24 horas.
- (⁸) La *E. coli* se utiliza en este caso como indicador de contaminación fecal.
- (⁹) Estos criterios se aplican a la carne separada mecánicamente producida con las técnicas contempladas en el anexo III, sección V, capítulo III, apartado 3, del Reglamento (CE) no 853/2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

3.2. Normas ISO

Las normas ISO son establecidas por el Organismo Internacional de Estandarización (ISO), y se componen de estándares y guías relacionados con sistemas y herramientas específicas de gestión aplicables en cualquier tipo de organización.

En concreto, la metodología para el control de microorganismos patógenos en industrias cárnicas se basa en distintas normas ISO, cada una específica para un patógeno concreto (Procedimientos estandarizados para exámenes microbiológicos de productos alimentarios según las normas ISO, Microbiología Alimentaria, The wise choice, Scharlau. [Food_ESP_28-09-2020_SAFE.pdf](#)).

3.2.1 *Listeria monocytogenes*

La norma ISO 11290-1 describe un método horizontal para la detección de *L. monocytogenes*. Método aplicable a alimentos listos para el consumo, tanto los destinados a lactantes y a usos médicos especiales, como a todos aquellos que puedan favorecer el desarrollo de este patógeno.

Por otro lado, la norma ISO 11290-2 describe un método horizontal para el recuento de *L. monocytogenes*. Método aplicable a alimentos listos para el consumo que puedan y que no puedan favorecer el desarrollo de este patógeno no destinados a lactantes ni a usos médicos especiales.

a) Norma ISO 11290-1:

El enriquecimiento primario o preparación de la solución inicial consiste en añadir una muestra objeto del ensayo de 25 g o ml a 225 g o ml de medio de enriquecimiento selectivo primario (Fraser media concentración) para obtener una proporción 1/10 (p/v o v/v), e incubarlo a 30°C durante 25 h $\pm$ 1 h. Para el enriquecimiento secundario se transfiere 0,1 ml de la solución inicial a 10 ml de medio de Enriquecimiento Secundario Fraser y se incuba a 37°C durante 24 h $\pm$ 2 h.

Se siembra la solución inicial en Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti con asa de siembra. Se repite con el cultivo de enriquecimiento secundario y, después se vuelve a hacer la operación con un segundo medio selectivo (Agar Oxford o Agar Palcam), siendo importante ajustar las condiciones de incubación a las del medio

selectivo seleccionado. Incubar las placas de Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti invertidas a 37°C durante 24 h $\pm$ 2-3 h, las colonias de *L. monocytogenes* se identifican por ser verde azuladas, rodeadas de un halo opaco. Incubar también las placas del segundo medio selectivo, según las indicaciones del fabricante.

Para confirmar la presencia de *Listeria* spp. se eligen 5 colonias presuntivas de cada placa y se siembran en placas de TSYEA o Agar Sangre o Agar Nutritivo para obtener colonias aisladas, tras incubación a 37°C durante 18-24 h. Las colonias características de este microorganismo son de entre 1-2 mm, convexas, incolores, opacas y con borde cerrado. Para confirmar la identificación deben realizarse la prueba de la Catalasa y tinción de Gram y, opcionalmente, ensayo de motilidad y de Voges Proskauer. La confirmación de *L. monocytogenes* se da tras llevar a cabo ensayos de hemólisis, de uso de carbohidratos y grasas, siendo opcional el Test de CAMP, Motilidad y Catalasa.

b) Norma ISO 11290-2:

Para el enriquecimiento primario o preparación de la solución inicial se añade una muestra de 25 g o ml a 225 ml de Agua Peptonada Tamponada o medio Fraser para obtener una proporción 1/10 (p/v o v/v) y se deja incubar a 20°C $\pm$ 2°C durante 1 h $\pm$ 5 min. (Si se precisa hacer diluciones, deben prepararse después de esta primera incubación).

Sembrar 0,1 ml de la solución inicial o de las diluciones decimales en placas de *Listeria* agar según Ottaviani y Agosti. En caso de tener un número bajo de este patógeno, sembrar 1 ml en 3 placas de 90 mm de diámetro e incubarlas a 37°C $\pm$ 1°C durante 24 h $\pm$ 2 h (más otras 24 h $\pm$ 2 h).

Considerar como presuntiva *Listeria* spp. las colonias azul verdosas con o sin halo opaco y como *L. monocytogenes*, las azul verdosas rodeadas por un halo opaco. Hacer el recuento de ambos tipos de colonias.

Para confirmar *Listeria* spp. hacer lo mismo que en el apartado 3.1.1, para la confirmación de *L. monocytogenes*: elegir 5 colonias presuntivas de cada placa, sembrarlas en placas de TSYEA o Agar Sangre o Agar Nutritivo para obtener colonias aisladas tras incubación a 37°C $\pm$ 1°C durante 18-24 h. Realizar ensayos de hemólisis

y de uso de carbohidratos de las colonias aisladas. De forma opcional, llevar a cabo el Test de CAMP, Motilidad, Catalasa y Gram.

3.2.2 *Salmonella* spp.

La norma ISO 6579 especifica un método horizontal para la detección de *Salmonella*, y es aplicable a carne picada y preparados cárnicos de consumo crudos y cocinados, productos cárnicos hechos a base de carne de aves, canales bovinas, ovinas, caprinas, equinas, porcinas y de pollo y carne de pavo.

Para el preenriquecimiento en caldo no selectivo se inoculan 25 g o ml de muestra en 225 ml de agua Peptonada Tamponada a temperatura ambiente (dilución 1/10) y se incuba a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. El enriquecimiento en caldo selectivo consiste en inocular con 0,1 ml del cultivo obtenido en el preenriquecimiento un tubo con 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis e incubarlo a $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. De forma alternativa se puede inocular con la misma cantidad una placa MRSV Agar. Por otro lado, inocular con 1 ml del cultivo obtenido en el preenriquecimiento un tubo con 10 ml de caldo de Tetracionato/Novobiocina Müller-Kauffmann y dejar incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.

Sembrar en una placa de XLD Agar e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ y de un agar de segunda elección como Brilliant Green Agar, Hektoen Agar, *Salmonella Shigella* Agar o *Salmonella* Plus Chromogenic Agar.

Para confirmar la presencia de *Salmonella* spp. se subcultivan las colonias presuntivas en agar nutritivo a $34\text{-}38^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$, y se confirman mediante pruebas serológicas y bioquímicas apropiadas como TSI Agar, medio Lisina descarboxilación, prueba de Indol, Urea Agar o detección β -galactosidasa (incubadas a 37°C durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$, las tres primeras y a 37°C hasta 24 h las dos últimas).

3.2.3 *Campylobacter* spp.

La norma ISO 10272-2 describe un método horizontal para la detección y enumeración de *Campylobacter* spp. en canales de pollo de engorde.

A partir de la muestra, preparar una dilución seriada en BPW. Sembrar 0,1 ml de la solución inicial y sucesivas si es necesario, en agar modificado deoxicolato

cefoperazona carbón (mCCD Agar) e incubar en atmósfera microaerófila a 41,5°C durante 44 h $\pm$ 4 h.

Las colonias típicas de este patógeno son grisáceas, a menudo con un brillo metálico, planas y húmedas, con tendencia a extenderse. Se selecciona las placas con menos de 150 colonias típicas y se elige 5 de ellas para su confirmación. Esta confirmación consiste en sembrar las colonias típicas en placas de agar Columbia (Agar Sangre no selectivo), incubarlas en atmósfera microaerófila a 41,5°C durante 24-48 h y realizar pruebas de confirmación como morfología y movilidad (pequeños bacilos curvados), crecimiento aeróbico a 25°C (sembrar en agar Columbia e incubar a 25°C durante 44 h $\pm$ 4 h, observarlas en ausencia de crecimiento), prueba de la Oxidasa (positiva) o prueba opcional de la Catalasa (positiva).

3.2.4 *Clostridium perfringes*

La norma ISO 7937 describe un método horizontal para la detección de *C. perfringes* en alimentos. Para ello, inocular 25 g de muestra en 225 ml de agua de peptona tamponada y homogeneizar. Añadir 100 μ l del homogeneizado sobre placas con 20 ml de TSC con yema de huevo, extender y cubrir con sobrecapas de 10 ml de TSC sin yema de huevo, mantenidas a 44-47°C. Incubar en anaerobiosis (jarras con sobres generadores de atmósfera anaerobia) a 37°C durante 18-24 h (AENOR, 2005. UNE-EN ISO 7937, Norma Española, [ISO CLOSTRIDIUM.pdf](#))

3.2.5 *Echerichia coli*

La norma ISO 16649-1/2 describe un método horizontal para la enumeración de *E. coli* β -glucuronidasa positiva mediante la técnica del recuento con y sin membrana y la detección mediante la técnica del número más probable. Es aplicable a carne picada, carne separada mecánicamente y preparados cárnicos.

En primer lugar, colocar con pinzas estériles las membranas sobre la superficie de dos placas de Medio Mineral Modificado Glutamato Agar, añadir 1 ml de la suspensión inicial de la muestra al centro de cada membrana y extender. Repetir este paso con las siguientes diluciones. Se dejan las placas a temperatura ambiente durante 15 min y después se incuban a 37°C durante 4 h $\pm$ 1 h.

Transferir con pinzas estériles las membranas desde el Medio Mineral Modificado Glutamato a placas de TBX Agar e incubarlas a 44°C durante 18-24 h. Contar las UFC (unidades formadoras de colonias) de las colonias típicas de *E. coli* β -glucuronidasa positivas, en placas con más de 150 colonias típicas.

La segunda parte de esta norma consiste en transferir a placas Petri vacías y estériles 1 ml de la muestra (si es líquida) o 1 ml de la dilución inicial (10^{-1}) en el caso de otros productos. Inocular dos placas por dilución, añadir a cada placa 15 ml de medio TBX previamente enfriado en baño de agua a 42-47°C e incubar a 44°C durante 18-24 h. Por último, contar las UFC de las colonias típicas de *E. coli* β -glucuronidasa positivas, en placas con más de 150 colonias típicas.

3.3. Plan de trabajo

Este proyecto pretende asegurar que el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) de la industria alimentaria interesada es correcto y óptimo, no solo por cumplir la legalidad europea, sino por cubrir requisitos aún más exigentes a nivel de exportación a países como Japón; otorgando distinción a dicha industria en el mercado competitivo.

Tendrá una duración de dos años, desde enero de 2022 a diciembre de 2023. Durante este periodo, la industria alimentaria interesada proporcionará productos cárnicos determinados a analizar, todos ellos elaborados en la misma fecha, pertenecientes al mismo lote y manipulados por los mismos operarios.

Bajo las normas ISO, se estudiarán 8 tipos de productos cárnicos: 4 tipos curados (2 loncheados y 2 no loncheados) durante el primer año, y 4 tipos cocidos (2 loncheados y 2 no loncheados) en el segundo año. Los productos curados se analizarán a lo largo de sus 9 meses de vida útil y otros 3 meses después de su caducidad; mientras que, en los cocidos, será durante 6 meses de vida útil y un mes después de su caducidad. Es decir, se trata de llevar el histórico de un producto, desde el primer día que sale de fábrica hasta los 15 días, 30 días, 3 meses, 6 meses, 7 meses (en cocidos), 9 meses y 12 meses (en curados); siendo $t=0$ hasta $t=7$, respectivamente.

Los productos cárnicos curados a analizar son jamón serrano loncheado, salchichón loncheado, tripa de chorizo y tripa de salchichón; mientras que los

productos cocidos son jamón cocido loncheado, pavo cocido loncheado, barra de jamón cocido y barra de pavo cocido.

Del lote de productos suministrado por la empresa, se utilizan 5 sobres de producto cárnico (n=5) como muestra para analizar 5 tipos de bacterias diferentes (*L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *C. perfringens* y *E. coli*), cada una por triplicado. Obteniendo un total de 75 muestras (5x5x3) de cada producto cárnico para cada tiempo determinado (t=0, t=1, t=2...).

3.3.1 Cronograma

ACTIVIDAD 1: ANÁLISIS PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS																									
		AÑO 1												AÑO 2											
		ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic
Tarea 1.1	Jamón serrano loncheado																								
Tarea 1.2	Salchichón loncheado																								
Tarea 1.3	Tripa de chorizo																								
Tarea 1.4	Tripa de salchichón																								

ACTIVIDAD 2: ANÁLISIS PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS																									
		AÑO 1												AÑO 2											
		ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic
Tarea 2.1	Jamón cocido loncheado																								
Tarea 2.2	Pavo cocido loncheado																								
Tarea 2.3	Barra de jamón cocido																								
Tarea 2.4	Barra de pavo cocido																								

ACTIVIDAD 3: OTROS																									
		AÑO 1												AÑO 2											
		ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic
Tarea 3.1	Revisión de resultados																								
Tarea 3.2	Análisis estadísticos																								
Tarea 3.3	Asistencia a congresos																								
Tarea 3.4	Redacción paper																								

	Investigador 1
	Investigador 2
	Personal técnico con cargo al proyecto

3.3.2 Plan financiero

Gastos de ejecución de la actividad 40250 €

Gastos del personal.....32500 €

La participación en el proyecto del técnico solicitado será crucial para el desarrollo de la parte experimental, es decir, elaboración de medios, siembra e incubación de muestras.

Costes de adquisición, reparación, mantenimiento y alquiler de material.....300 €

No se solicita presupuesto alguno para la adquisición de material inventariable, ya que el grupo de investigación tiene a su disposición laboratorios totalmente equipados y que permiten el desarrollo de los ensayos previstos. Se incluye únicamente presupuesto para cubrir gastos de reparaciones y labores de mantenimiento del instrumental a utilizar.

Costes de adquisición de material fungible, suministros y productos similares...5500 €

Esta sección abarca material de plástico de laboratorio (Placas Petri, bolsas de homogeneización, asas de siembra de plástico, tubos cónicos de propileno, frascos roscados y de tipo duquesa, puntas con filtro, puntas universales para pipetas automáticas), medios de cultivo bacteriano (medio de enriquecimiento primario y secundario Fraser, Agar *Listeria*, Agar Sangre, Brilliant Green Agar, Urea Agar, TSC con yema de huevo, TBX Agar), agua de peptona tamponada, pruebas de la Oxidasa o Catalasa, entre otros.

Costes derivados de formación, divulgación, publicaciones y transferencia.....1200 €

Se incluye presupuesto para cubrir gastos de publicación y divulgación de los resultados derivados del proyecto (revistas científicas OA como Elsevier o Royal Society), así como inscripción a cursos y congresos que puedan enriquecer el desarrollo del mismo (como el Congreso Internacional de Calidad y Seguridad Alimentaria de ACOFESAL, que se celebrará entre el 19 y el 21 de junio de 2022 en Barcelona y el XXV Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos de Tarragona, del 17 al 20 de septiembre de 2023).

Costes derivados de viajes, dietas y desplazamientos.....450 €

Asistencia a congresos mencionados anteriormente.

Otros gastos relacionados directamente con el proyecto.....300 €

Imprevistos posibles resultantes durante la duración del proyecto.

Costes indirectos 4875 €

4. OPORTUNIDAD DEL PROBLEMA PLANTEADO PARA LA ECONOMÍA, GRADO DE INNOVACIÓN DE LA PROPUESTA Y JUSTIFICACIÓN DEL POTENCIAL IMPACTO CIENTÍFICO Y/O TECNOLÓGICO

La importancia de este proyecto radica en la garantía de asegurar que determinados productos cárnicos tengan una seguridad alimentaria óptima. De esta forma, se previenen intoxicaciones alimentarias y pérdidas económicas considerables, y se incrementa la oportunidad empresarial de destacar notablemente en el sector, tanto a nivel nacional como internacional.

La Estrategia de Innovación de Andalucía 2020 “pretende superar un conjunto de retos que permitan implementar un cambio sustancial en las estructuras y comportamientos de los agentes que caracterizan el actual modelo productivo de la región” (RIS³ Andalucía, 2020), y este proyecto se ajusta perfectamente a varios de estos retos, como:

- a) “Mejorar significativamente la propensión a innovar de la sociedad andaluza”.
- b) “Lograr que la innovación sea un signo de identidad de la sociedad andaluza”.
- c) “Posicionar al sector privado como líder de los procesos de innovación en Andalucía”.
- d) “Conseguir que Andalucía sea referente internacional en la investigación, el desarrollo y la innovación en las prioridades fijadas en la Estrategia de Innovación de Andalucía”.
- e) “Lograr que el capital de conocimiento con el que cuenta Andalucía se utilice óptimamente para el desarrollo de la región”.
- f) “Hacer que las administraciones públicas andaluzas sean altamente innovadoras y que sus servicios y relaciones con los ciudadanos se realicen aplicando los mejores medios, técnicas y herramientas que los desarrollos tecnológicos permitan”.

El carácter innovador de este proyecto radica en asegurar un buen sistema APPCC y la ausencia microbiana tiempo después de la caducidad del producto cárnico, aumentando así su atractivo tanto para el consumidor habitual como para el mercado internacional. Esta pequeña pero crucial innovación aporta una gran seguridad alimentaria, prolongando la calidad del producto alimentario en un mercado donde es habitual la retirada de lotes de éstos por presencia de patógenos microbianos.

Cuando el presente proyecto genere beneficios a corto plazo, alentará a otras empresas a renovarse. De esta forma, se propiciará la investigación y la necesidad de modernizar instalaciones y servicios, situándose el sector privado como líder en innovación. También se cubre una línea de acción sobre “Avances en calidad, trazabilidad y seguridad alimentaria”, una de las prioridades de especialización de La Estrategia de Innovación de Andalucía 2020. De ser aprobado este proyecto y otros de la misma índole, se aseguraría que el capital de conocimiento andaluz va dirigido hacia el progreso de la Comunidad Autónoma. Así pues, se cumplirían todos los retos mencionados con anterioridad.

5. RESULTADOS ESPERADOS. PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN

Se espera que no aparezca crecimiento microbiano en ningún ensayo, demostrando así que la empresa cárnica tiene un sistema APPCC óptimo y que cumple con requisitos muy estrictos a nivel microbiológico para poder exportar sus productos a países con especiales requerimientos en cuanto a la seguridad microbiológica, como Japón.

Los resultados obtenidos se publicarán en revistas de alto impacto dentro del ámbito del proyecto como *Food Microbiology*, *International Journal of Food Microbiology* o *Food Control*, entre otras. También se divulgarán en diferentes cursos y congresos relacionados con el tema, como el Congreso Internacional de Calidad y Seguridad Alimentaria de ACOFESAL, que se celebrará entre el 19 y el 21 de junio de 2022 en Barcelona y el XXV Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos de Tarragona, del 17 al 20 de septiembre de 2023.

Una vez llevado a cabo el presente proyecto, servirá de modelo y/o ejemplo para otras empresas cárnicas con ambición de mejorar y obtener mayores beneficios.

Incluso podría adaptarse a otras industrias alimentarias que trabajen con alimentos con potencial aparición microbiana, como pescado o lácteos. Para ello, sería necesario modificar las normas ISO y el plan de trabajo.

6. MEMORIA ESPECÍFICA DEL IMPACTO INTERNACIONAL

Según el estudio de Galindo, Mariana & Viridiana Ríos (2015), las exportaciones son importantes porque afectan al crecimiento económico, a la productividad y al empleo del país en cuestión, España en este caso. El Producto Interno Bruto (PIB) se define como:

$$PIB = C + I + G + (X - M)$$

Donde,

C = consumo

I = inversión

G = gasto público

X = exportaciones totales

M = importaciones totales

Por lo que un aumento de las exportaciones supone un incremento del PIB, es decir, implica crecimiento económico. Además, las exportaciones tienen una incidencia positiva en la productividad porque favorecen la recolocación de recursos provocando una mayor productividad de la economía en su conjunto, lo que a su vez induce un mayor crecimiento económico. Asimismo, el comercio internacional impacta positivamente en el empleo cuando reasigna su fuerza laboral a empresas más productivas (Galindo, Mariana & Viridiana Ríos, 2015).

“Otro mecanismo por el cual las exportaciones pueden impactar positivamente en la productividad es mediante la mejora de la técnica de producción. Esta mejora se da como un proceso de aprendizaje al enfrentar la demanda extranjera, la cual puede exigir mayor cantidad y calidad” (Galindo, Mariana & Viridiana Ríos, 2015), como es el caso de Japón, que para evitar la introducción de enfermedades infecciosas de

origen animal en productos cárnicos, carnes u otros productos de origen animal importados, considera necesario aplicar una cuarentena para evaluar la salud del animal importado. El MAFF (*Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries*) regula los procedimientos para importar ganado y sus productos y los requisitos pueden ser encontrados en el procedimiento estándar para la importación a Japón de artículos designados que deben puestos en Cuarentena (*Standard Procedure for Approval for Import of Designated Items into Japan to be Quarantined*) y la Ley de Control de Enfermedades Infecciosas en Animales Domésticos (*Domestic Animal Infectious Diseases Control Law*) (Shin & Almeida, 2012).

Según el Informe Anual de Comercio Exterior Agroalimentario, Pesquero y Forestal 2019 (2020), la exportación de carnes no ha dejado de aumentar desde 2010, lo que ha hecho que se experimente en el periodo analizado un llamativo crecimiento en su saldo, pasando de un saldo positivo de 1.774 M€ en 2010, a 5.770 M€ en 2019. De hecho, la carne de porcino se sitúa como el principal producto exportado en 2019, generando 4.581,98 M€.

Por otro lado, Japón se coloca en el quinto puesto de países destino de exportación de carnes, gastando en 2019 una media de 510,68 M€: cinco veces más que países como Reino Unido o República Checa. De hecho, el principal producto demandado por este país asiático es la carne de porcino, en el que gasta 493M€, casi el 97% del total del presupuesto utilizado en productos exportados (Informe Anual de Comercio Exterior Agroalimentario, Pesquero y Forestal 2019, 2020).

Tras conocer los muchos beneficios de exportar, el aumento de la exportación de carnes desde 2010 y que uno de los países que más hace uso de ésta es Japón, se deja constancia de la importancia de este proyecto y el gran impacto positivo a nivel internacional que tendrá sobre las empresas que lo apliquen.

BIBLIOGRAFÍA

Abebe, E., Gugsu, G., & Ahmed, M. (2020). Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. *Journal of tropical medicine*, 2020, 4674235.

AENOR (2005). UNE-EN ISO 7937, Norma Española. [ISO CLOSTRIDIUM.pdf](#)

Alertas Alimentarias de Interés General, Seguridad Alimentaria. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), Ministerio de Consumo, Gobierno de España.

Bantawa, K., Rai, K., Subba Limbu, D., & Khanal, H. (2018). Food-borne bacterial pathogens in marketed raw meat of Dharan, eastern Nepal. *BMC research notes*, 11(1), 618.

Bintsis T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS microbiology*, 3(3), 529–563.

Choi, J. R., Yong, K. W., Choi, J. Y., & Cowie, A. C. (2019). Emerging Point-of-care Technologies for Food Safety Analysis. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 19(4), 817.

Comisión del programa de implantación de sistemas de autocontrol en la Comunidad de Madrid (2007). Guía para el diseño, implantación y mantenimiento de un sistema APPCC y prácticas correctas de higiene en las empresas alimentarias. Requisitos básicos en la Comunidad de Madrid. Documentos Técnicos de Salud Pública nº 116, Dirección General de Salud Pública y Alimentación, Salud Madrid. <https://www.ucm.es/data/cont/docs/483-2013-10-10-DTSP.pdf>

Doménech, E. (2013). Sistemas de gestión: calidad y seguridad en la industria agroalimentaria, 2ª edición. Colección Académica, Universitat Politècnica de València. https://gdocu.upv.es/alfresco/service/api/node/content/workspace/SpacesStore/8230f856-a302-4e89-be98-0d264012d0db/TOC_0829_09_02.pdf?quest=true

Elbehiry, A., Marzouk, E., Abdeen, E., Al-Dubaib, M., Alsayeqh, A., Ibrahim, M., Hamada, M., Alenzi, A., Moussa, I., & Hemeg, H. A. (2019). Proteomic characterization and discrimination of *Aeromonas* species recovered from meat and water samples with a spotlight on the antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila*. *MicrobiologyOpen*, 8(11), e782.

FAO (1997). Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) y Directrices para su Aplicación. Anexo al CAC/RCP-1 (1969), Rev. 3 (1997), <http://www.fao.org/3/Y1579S/y1579s03.htm>.

FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS. Obra digital de *Campylobacter*, <https://focusedcollection.com/sp/stock-photos/campylobacter.html?iv=161674028>.

FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS. Obra digital de *Clostridium perfringens*, <https://focusedcollection.com/sp/stock-photos/clostridium.html?iv=199523062>.

FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS. Obra digital de *Echerichia coli*, <https://focusedcollection.com/sp/stock-photos/coli.html?iv=160217762>.

FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS. Obra digital de *Listeria monocytogenes*, <https://focusedcollection.com/sp/stock-photos/listeriamonocytogenes.html?iv=389315996>.

FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS. Obra digital de *Salmonella* spp., <https://focusedcollection.com/sp/stock-photos/salmonella.html?iv=160166370>.

FOCUSED COLLECTION by DEPOSITPHOTOS. Obra digital de *Staphylococcus aureus*, <https://focusedcollection.com/sp/stock-photos/aureus.html?iv=160225366>.

Fung, F., Wang, H. S., & Menon, S. (2018). Food safety in the 21st century. *Biomedical journal*, 41(2), 88–95.

Galindo, Mariana & Viridiana Ríos (2015). “Exportaciones” en Serie de Estudios Económicos, Vol. 1, Julio 2015. Mexico DF: México ¿cómo vamos? https://scholar.harvard.edu/files/vrios/files/201507_mexicoexports.pdf?m=1453513184

Gizaw Z. (2019). Public health risks related to food safety issues in the food market: a systematic literature review. *Environmental health and preventive medicine*, 24(1), 68.

Información específica sobre la exportación a Japón, Gobierno de España, pp. 1-4. <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/JaponProcedEspAves.pdf>

Informe Anual de Comercio Exterior Agroalimentario, Pesquero y Forestal 2019 (2020). Subdirección General de Análisis, Coordinación y Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/analisis-y-prospectiva/informeannual2019_tcm30-542612.pdf

iStock by Getty Images. Obra digital de *Yersinia enterocolítica*,
<https://www.istockphoto.com/es/foto/bacteria-de-la-yersinia-enterocol%C3%ADtica-gm986043466-267491505>.

Kiu, R., & Hall, L. J. (2018). An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 141.

Procedimientos estandarizados para exámenes microbiológicos de productos alimentarios según las normas ISO, Microbiología Alimentaria, The wise choice, Scharlau. [Food ESP 28-09-2020 SAFE.pdf](#)

RIS³ Andalucía (2020). Estrategia de Innovación de Andalucía 2020. Andalucía se mueve con Europa, Junta de Andalucía, Fondo Europeo de Desarrollo Regional UE, pp. 119-122.

SciencePhotoLibrary. Obra digital de *Aeromonas hydrophila*,
<https://www.sciencephoto.com/media/1020917/view/aeromonas-hydrophila-bacteria-sem>.

Shamloo, E., Hosseini, H., Abdi Moghadam, Z., Halberg Larsen, M., Haslberger, A., & Alebouyeh, M. (2019). Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iranian journal of veterinary research*, 20(4), 241–254.

Shin, S. & Almeida, J. (2012). Guía práctica para exportar productos agrícolas a Corea del Sur, Japón y Singapur. *Banco Interamericano de Desarrollo (BID)*, Sector de Integración y Comercio. <https://idbdocs.iadb.org/wsdocs/getdocument.aspx?docnum=37222426>

Unión Europea. Reglamento (CE), nº 2073/2005, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L 338, 15 de noviembre de 2005, pp. 1-2.